

발간등록번호

11-1543000-001496-01

형질전환 기술을 이용한 애완용 소형 닭의 생산 최종보고서

2016. 9. 22.

주관연구기관 / 대구가톨릭대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환 기술을 이용한 애완용 소형 닭의 생산”(개발기간 : 2011. 9. 23 ~ 2016. 9. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 9. 22.

주관연구기관명 : 대구가톨릭대학교 산학협력단 (인)
참여기관명 : (주) 벤텍사이언스 (인)

주관연구책임자 : 김태완

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	111055-5	해당 단계 연구 기간	2015.09.23. - 2016.09.22	단계 구분	5/5
연구 사업명	중 사업명	농림축산식품 연구개발사업			
	세부 사업명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제명	대 과제명	해당사항 없음			
	세부 과제명	형질전환 기술을 이용한 애완용 소형 닭의 생산			
연구 책임자	김태완	해당단계 참여 연구원 수	총: 7명 내부: 5명 외부: 2명	해당단계 연구 개발비	정부: 180,000천원 민간: 60,000천원 계: 240,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 36명 내부: 26명 외부: 10명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	대구가톨릭대학교 산학협력단 의과대학 의예과			참여기업명 (주) 벤틱사이언스	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 성장에 관여하는 호르몬 유전자의 발현을 인위적으로 억제하기 위한 shRNA의 확보와 각 shRNA가 tetracycline-inducible promoter의 통제 하에 도입된 virus vector system의 구축 및 shRNA에 의한 성장 관련 호르몬 유전자 발현의 knock-down 효율 검정 2. 구축한 virus vector system을 이용하여 생산한 고감염성의 virus를 유정란의 배반엽층에 미세주입한 후 대리난각 부화 방법으로 1세대 형질전환 애완용 소형 닭의 생산 3. 1세대 형질전환 닭의 germline transmission 여부를 확인한 후 2세대 형질전환 닭의 생산 4. 생산된 2세대 형질전환 닭의 분자생물학적 분석 및 성장 관련 호르몬 유전자의 발현을 억제하는 shRNA에 의한 개체의 생리학적인 변화 양상 검정 5. 구축한 virus vector system을 이용하여 녹색 형광 닭과 국내 관상용 재래 닭의 소형화 실시 6. 생산된 형질전환 애완용 소형 닭의 분자생물학적, 생리학적 검정 실시 및 품종 고정 				157 page	

4. 국문 요약문

		D-01			
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구의 목표는 닭의 체성장에 관여하는 호르몬 유전자의 발현을 억제하여 형질전환 애완용 소형 닭을 생산하는 것이다. 이의 일환으로 성장 관련 호르몬 유전자의 발현을 억제할 수 있는 shRNA를 도입한 tetracycline-inducible virus vector system을 구축하여 고감염성의 virus를 생산하고자 하였으며, 생산한 virus를 stage X 시기의 수정란의 배반엽층에 미세주입한 후 대리난각을 실시함으로써 애완용 소형 닭을 개발하고자 하였다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 성장에 관여하는 호르몬(성장호르몬과 성장호르몬 수용체, 인슐린-유사 성장인자)의 발현을 인위적으로 억제할 수 있는 shRNA의 확보 및 각 shRNA를 tetracycline-inducible promoter나 조직 특이적 promoter의 통제 하에 도입한 형태의 virus vector system의 구축 2. 구축한 virus vector system을 이용하여 고감염성의 virus를 생산한 후 수정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각을 실시함으로써 형질전환 애완용 소형 닭 생산 및 계통 확립 3. 생산된 형질전환 닭의 분자생물학적 분석 및 shRNA로 인한 성장 관련 호르몬 유전자 발현의 knock-down 양상에 대한 생리학적인 검정 실시 4. 본 연구에서 구축한 형질전환 기술을 이용하여 녹색 형광 닭과 국내 관상용 재래 닭의 소형화 실시 				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 성장에 관여하는 호르몬의 발현을 억제할 수 있는 shRNA의 확보 및 <i>in vitro</i> 검정 2. 각 shRNA가 tetracycline-inducible promoter의 통제 하에 도입된 virus vector system의 구축 및 shRNA에 의한 성장 관련 호르몬 유전자 발현의 knock-down 효율 검정 3. 구축한 virus vector system을 이용하여 고감염성의 retrovirus를 생산한 후 수정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 부화 방법으로 1세대 형질전환 애완용 소형 닭의 생산 4. 1세대 형질전환 닭의 germline transmission 여부를 확인한 후 2세대 형질전환 닭의 생산 5. 생산된 2세대 형질전환 닭의 분자생물학적 분석 및 성장 관련 호르몬 유전자의 발현을 억제하는 shRNA에 의한 개체의 생리학적인 변화 양상 검정 6. 성장 관련 인자에 대한 shRNA가 도입된 tetracycline-inducible virus vector system을 이용하여 녹색 형광 닭과 국내 관상용 재래 닭의 소형화 실시 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 애완용 소형 닭의 상용화를 통한 축산 농가의 고부가가치 경제 소득원 창출 2. 본 연구에서 구축한 특정 유전자의 발현을 억제할 수 있는 shRNA vector system을 이용하여 다양한 종의 소형 동물을 생산함으로써 애완용뿐만 아니라 이종장기 등의 임상 실험용 모델 동물의 생산에 직접적으로 적용 가능 3. 성장호르몬과 인슐린-유사 성장인자 등의 생리학적 특성을 규명하는 기초의학 연구에 중요한 실험 모델 동물로 제공 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>형질전환 애완용 소형 닭</p>	<p>바이러스 벡터 시스템</p>	<p>성장호르몬</p>	<p>인슐린-유사 성장인자</p>	<p>테트라사이클린 유도적 발현</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		D-02			
Purpose& Contents	<p>The principal objective of this study is production of miniature pet chickens by shRNA-mediated knock-down of appropriate genes responsible for growth. To accomplish this goal, firstly, we constructed tetracycline-inducible retrovirus or lentivirus vector system designed to express the shRNA in a tetracycline-dependent manner. Then, we tried to introduce the transgene of our interest to the chicken by injecting highly concentrated vector virus into the blastoderm of stage X embryo.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Selection of appropriate shRNA sequences efficiently inhibiting expression of growth-related genes (growth hormone, growth hormone receptor, and insulin growth factor I), followed by construction of retrovirus or lentivirus vector system designed to express the shRNA under the control of tetracycline-inducible promoter. 2. Production of recombinant virus with high infectivity to inject the concentrated virus stock underneath the blastoderm, followed by incubation of the manipulated eggs using surrogate egg shells. 3. Molecular biological and physiological analyses to determine the inhibitory knock-down effects to the target gene expression in the transgenic chickens. 4. Generation of miniature green fluorescent transgenic chickens and Korean traditional pet chickens by applying the miniature techniques and experience accumulated in performing this study. 				
Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. Confirmation of knock-down effects of the selected shRNAs <i>in vitro</i> 2. Construction of virus vector system we schemed, and confirmation of the tetracycline-inducible inhibitory effects of the shRNA in the virus vector. 3. Production of G0 generation shRNA transgenic chickens by injecting the concentrated recombinant virus stock underneath the blastoderms of the eggs, followed by incubation of the manipulated eggs using surrogate egg shells. 4. Confirmation of germline transmission of the transgene bhy screening of the germ cells of G0 founder chickens, followed by production of the G1 generation transgenic chickens. 5. Molecular biological and physiological analyses to determine the inhibitory knock-down effects to the target gene expression in the G1 generation transgenic chickens. 6. Production of miniature green fluorescent transgenic chickens and Korean traditional pet chickens of G0 generation. 				
Expected Contribution	<p>The results and experience acquired in performing this study could contribute</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. in creating a higher value-added business in the animal husbandry area by commercialization of the miniature chickens. 2. in producing miniature domestic mammals including pigs that can be used in xenoplantation. 3. in providing a powerful experimental model system in growth-related study. 				
Keywords	transgenic miniature pet chicken	virus vector system	growth hormone	insulin-like growth factor	tetracycline-indu cible expression

6. 영문목차

Chapter 1. Summary of the study	9
Section 1. Objective of the study	9
Section 2. Research and development necessity	9
Section 3. Scope of the study	10
Chapter 2. Domestic and foreign status of current research and development	12
Section 1. Current status of the research & development and the market	12
Section 2. Current position of the results obtained from this study in current internal and external trends of research and development	15
Chapter 3. Contents and the results of the study	16
Section 1. Theoretical and experimental approach	16
1. Strategy and methods of the research	16
2. Research promotion system	19
3. Research schedule	20
Section 2. Contents and results of the study	22
1. Construction of expression vector system designed to inhibit the genes involved in body growth	22
2. Production of miniature transgenic chickens expressing shRNA designed to inhibit expression of the genes involved in body growth	73
Section 3. Outcomes of research and developments	140
1. Intellectual property rights	140
2. Registration of genetic resources	140
3. Publication of scientific articles	141
4. Presentation in the scientific conference	141
Chapter 4. Achievements and contribution to the related area	144
Section 1. Achievements	144
Section 2. Contribution to the related area	149
Chapter 5. Application plan of the results	150
Section 1. Necessity for further studies	150
Section 2. Application to other studies	150
Section 3. Promotion plan for commercialization	150

Chapter 6. Scientific and technical information from foreign countries in performing the study	151
Chapter 7. Security level of research outcome	151
Chapter 8. Facility and equipments registered to national science and technology information system	151
Chapter 9. Record of safety actions in the lab in performing the study ·	152
Chapter 10. Representative outcome of the study	153
Chapter 11. The others	154
Chapter 12. References	155
<Enclosure> self-evaluation report	

7. 본문목차

< 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의개요	9
제 1 절. 연구개발 목적	9
제 2 절. 연구개발의 필요성	9
제 3 절. 연구개발 범위	10
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	12
제 1 절. 국내외 관련분야에 대한 기술개발 및 시장 현황	12
제 2 절. 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	15
제 3 장. 연구수행 내용 및 결과	16
제 1 절. 연구개발의 이론적, 실험적 접근방법	16
1. 연구개발 추진 전략 및 방법	16
2. 연구개발 추진체계	19
3. 연구개발 추진일정	20
제 2 절. 연구내용 및 결과	22
1. 체성장 관련 유전자의 발현 억제를 위한 vector system의 구축	22
2. 체성장 관련 유전자에 대한 shRNA를 도입한 형질전환 닭의 생산	73
제 3 절. 연구개발성과	140
1. 지식재산권	140
2. 유전자원 등록	140
3. 논문게재	141
4. 학술회의 발표	141
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	144
제 1 절. 목표달성도	144
제 2 절. 관련분야에의 기여도	149
제 5 장. 연구결과의 활용계획	150
제 1 절. 추가연구의 필요성	150
제 2 절. 타 연구에의 응용	150
제 3 절. 기업화 추진방안	150

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	151
제 7 장. 연구개발성과의 보안등급	151
제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	151
제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	152
제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	153
제 11 장. 기타사항	154
제 12 장. 참고문헌	155

<별첨> 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

본 연구의 목표는 형질전환 소형 닭 생산 방법의 확립과 생산된 애완용 형질전환 닭의 분자생물학적, 생리적 특성을 분석하고 충분한 개체 수 확보와 계통을 확립하는 것이다. 이의 일환으로 성장 관련 호르몬 유전자의 발현을 억제할 수 있는 shRNA를 도입한 tetracycline-inducible virus vector system을 구축하여 고감염성의 virus를 생산하고자 하였다. 생산한 virus를 stage X 시기의 수정란의 배반엽층에 미세주입한 후 대리난자를 실시함으로써 애완용 소형 닭을 개발하고자 하였다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

형질전환 동물을 이용하여 경제적 이익을 창출하고자 하는 연구는 지금까지 포유류 가축의 유즙 혹은 닭의 난백을 통해 고가의 생리활성물질을 얻는데 치중되어졌다(Park 등, 2006; Kodama 등, 2008; Kwon 등, 2008). 그러나 이러한 연구는 20년 이상의 연구에도 불구하고 실제로 경제적 가치가 인정된 성공적인 사례는 전 세계적으로 1-2 건에 불과하다. 주된 이유로 외래 단백질의 조절되지 않은 지속적 생산으로 인한 형질전환 동물의 생리학적 이상과 생산된 단백질의 당쇄화(glycosylation)가 인간의 것과 다른 점을 들 수 있다. 전자의 문제점은 최근의 발전된 분자생물학적 기술을 이용하여 어느 정도 극복이 가능하리라고 예상되나, 후자의 문제점은 아직까지 뚜렷한 해결책이 없는 실정이다. 또한 최근에 “동물세포(주로 Chinese Hamster Ovary cell)의 체외 배양을 통해 원하는 단백질을 생산하는 기술”의 급속한 발전으로 치료용 단백질의 대량 생산이 가능해짐에 따라 형질전환 가축을 통해 이러한 목적을 달성하고자 하는 시도는 점점 그 경쟁력을 잃어가고 있다. 이 외에도 형질전환 동물을 이용하여 생산한 치료용 단백질은 상품화되기 전에 여러 단계의 전임상 실험이 요구되는데 이는 경제적, 시간적인 소모가 매우 크며 성공적인 사례도 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 단시간 내에 상품화가 가능한 애완용 형질전환 동물 개발에 중점을 두고자 하였다. 현재 국내의 애완동물 시장은 1인 가구의 증가 및 이색 애완동물 마니아 증가와 저출산 및 고령화 등의 원인에 의해 급격한 증가를 나타내고 있다. 애완동물의 범위도 종래의 개나 고양이가 그리고 관상용 조류에서 파충류, 어류와 곤충에 까지 그 영역이 거의 모든 종의 동물로 확대되고 있다. 하지만 현재의 대부분 애완동물은 개나 고양이로서 이에 비하면 조류는 수적으로 미미한 실정이다. 그러나 현재 아파트나 공동 주택 생활을 많이 하고 있는 사람들은 사육이 용이하고 사육 비용이 적게 들며 이색적이고 희귀성을 가지는 애완동물에 대한 수요 욕구가 점점 커지고 있다. 닭의 경우 여러 관상용 닭이 보급되어 있으나 애완용으로서의 수용 확대에 있어서 가장 큰 문제점은 체구가 실내에서 사육하기에 너무 크다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유전공학을 이용하여 관상용 미니 닭을 개발할 경우 애완동물 시장에 새로운 바람을 일으킬 수 있을 것으로 기대되며 또한 그 닭의 시장성은 아주 클 것으로 예상된다. 실제 말레이시아에서는 체고가 15cm 정도인 미니 닭이 애완용으로 인기가

있는데 1마리 당 가격이 최고 US \$ 5,500에 달한다. 닭은 포유동물에 비해 성숙속 기간과 세대간격이 짧고, 번식능력이 탁월하며, 형질전환이 이루어진 가금의 계통 성립이 용이하고, 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하기 때문에 비교적 적은 연구비와 짧은 연구기간 내에 성공적인 결과를 도출할 수 있다. 본 연구에서 개발하고자 하는 미니 닭은 희귀 애완동물을 수입하는 비용을 줄이고 역으로 수출을 통한 이익을 창출함으로써 국가 경제에 도움이 될 것이며 성장 저해와 관련된 질병 관련 연구에 필요한 질환 모델 동물 공급에도 기여할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발하고자 하는 형질전환 미니 닭은 기존의 실험동물의 대부분인 마우스, 물모트와는 같은 사육 시설을 공유하기는 어려우나, 닭의 사육 시설은 기존의 마우스, 물모트용 사육시설보다 훨씬 저렴하게 건설할 수 있고 유지 및 관리도 훨씬 용이할 것으로 판단된다. 또한 미니 닭에 대한 상업적 실효성에 관해서 본 연구진이 판단으로는 가능성이 아주 높다고 예상된다. 많은 초등학생들이 가정에서 예쁜 병아리를 키우고 싶어 하는 강렬한 동심(童心)과 관상용 닭 애호가들의 넓은 저변 등을 고려할 때, 실내 사육이 가능한 소형화된 애완용 닭의 시장성은 충분하다고 예상하며 더욱이 이러한 유전공학적 시도는 본 연구가 최초인 만큼, 본 연구 결과는 장차 유전공학을 접목한 농업의 미래에 많은 참고 자료를 제공할 수 있으리라 판단된다. 또한 본 연구에서 수행하는 닭 소형화 기술은 장차 포유 가축의 소형화 연구에도 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 소형화된 돼지, 고양이, 그리고 개의 경우는 애완용으로써 뿐만 아니라 임상 실험용으로도 그 실용적 가치가 무한할 것이다.

제 3 절. 연구개발 범위

동물의 체성장은 직간접적으로 성장에 관련하는 호르몬과 조절 인자, 그리고 호르몬 수용체들이 관여하는 복잡한 기작에 의해 이루어진다. 성장을 조절하거나 성장과 관련된 질환 연구를 위하여 표적이 되는 유전자는 호르몬뿐만 아니라 수용체 유전자도 그 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 성장호르몬(growth hormone, GH)과 인슐린 유사 성장인자(insulin-like growth factor 1, IGF-1), 그리고 성장호르몬 수용체인 growth hormone receptor (GHR) 유전자를 표적으로 하여 각 유전자의 발현을 유도적으로 억제할 수 있는 system을 확립하고자 하였다. GH는 뇌하수체에서 분비되는 peptide hormone으로, 체성장을 촉진하고 세포의 재생과 노화를 억제하며 물질대사 조절 기능을 가지는 성장 인자이다. 표적 인자 중 IGF-1은 70개의 아미노산으로 이루어진 peptide hormone으로서 GH의 조절 하에 주로 간에서 합성 및 분비된다. IGF-1은 세포성장과 분화를 조절하여 성장을 촉진할 뿐만 아니라 뼈, 근육, 신경조직을 형성하며 손상된 세포를 재생시키는 역할을 한다. 또한 뇌하수체에 작용하여 GH의 분비를 억제하는 되먹임 작용을 나타낸다. 성장호르몬의 수용체 역할을 담당하고 있는 GHR은 세포막을 관통하는 구조를 가지며, GH의 표적세포에 대한 반응에 필수적이다. 이에 GH와 IGF-1, 또는 GHR의 발현을 억제하게 되면 성장이 저해되어 해당 동물의 소형화가 가능할 것으로 예상하였다. 형질전환 소형 닭의 생산을 위한 본 연구의 구체적인 개발 범위는 다음과 같다.

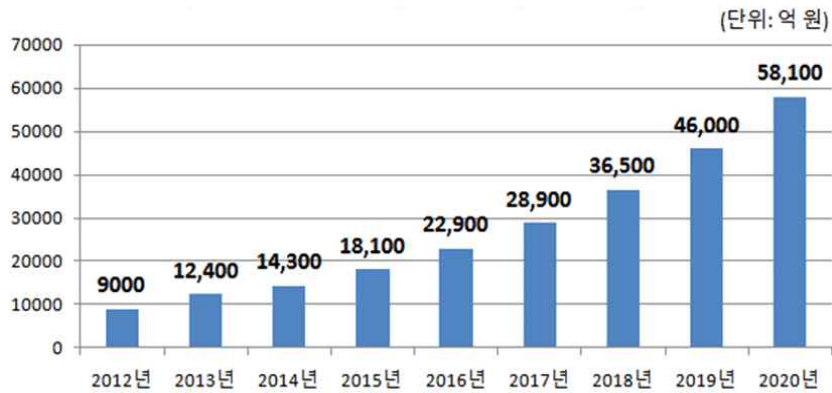
1. 성장에 관여하는 호르몬(성장호르몬과 인슐린-유사 성장인자)의 발현을 인위적으로 저해할 수 있는 shRNA의 확보 및 *in vitro* 검정
2. 각 shRNA가 tetracycline-inducible promoter의 통제 하에 도입된 virus vector system의 구축 및 shRNA에 의한 성장 관련 호르몬 유전자 발현의 knock-down 효율 검정
3. 구축한 virus vector system을 이용하여 고감염성의 retrovirus를 생산한 후 유정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 부화 방법으로 1세대 형질전환 애완용 소형 닭의 생산
4. 1세대 형질전환 닭의 germline transmission 여부를 확인한 후 2세대 형질전환 닭의 생산 유도
5. 생산된 2세대 형질전환 닭의 분자생물학적 분석 및 성장 관련 호르몬 유전자의 발현을 저해하는 shRNA에 의한 개체의 생리학적인 변화 양상 검정
6. 성장 관련 인자에 대한 shRNA가 도입된 tetracycline-inducible retrovirus vector system을 이용하여 녹색 형광 닭과 국내 관상용 재래 닭의 소형화 실시
7. 생산된 형질전환 애완용 소형 닭의 분자생물학적, 생리학적 검정 실시 및 품종 고정

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

D-04

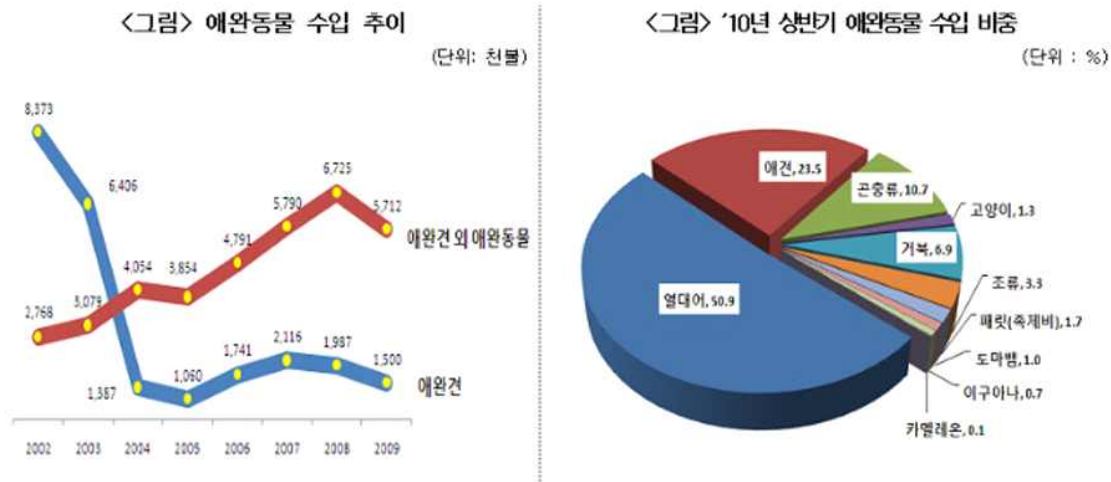
제 1 절. 국내외 관련분야에 대한 기술개발 및 시장 현황

RNAi system은 초파리나 생쥐의 배아, 사람의 세포 등 여러 개체에서 나타나는 gene-silencing 기작으로 1998년에 Fire 등에 의해 dsRNA에 의해 서열 특이적으로 유전자 발현을 억제할 수 있음을 처음으로 발견하였다. 이 후 2001년에 Elbashir 등이 포유류 세포에서 21 ~ 25 mer의 siRNA (short interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적인 발현 억제가 가능하다는 사실을 보고하였다. 이러한 작은 크기의 siRNA는 외부에서 단시간에 합성이 가능하고 신속하고 효율적으로 표적 유전자를 knock-down시킬 수 있는 장점을 가지나 높은 합성 비용과 siRNA 효율이 단시간동안만 지속된다는 단점을 가진다. 또한 세포 내로 유전자를 transfection하는 과정에서 세포에 따른 유전자 도입 효율이 매우 저조하거나 도입된 유전자가 시간의 경과에 따라 세포 내에서 소실되어 버리는 현상도 나타난다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 50 ~ 70 bp의 shRNA (Paddison 등, 2002; Brummelkamp 등, 2002)를 합성하여 virus vector system에 도입하고자 하였다. shRNA는 sense, antisense oligomer가 5 ~ 10 bp nucleotide의 loop 부위 양쪽으로 위치하여 서로 상보적으로 연결된 hairpin stem loop의 형태를 이루고 있다. 본 연구에서는 shRNA를 합성하여 retrovirus vector에 도입함으로써 세포나 개체 내에서 장시간에 걸쳐 RNAi 효과가 유지되도록 하였다. 또한 개체 발생과 증식, 그리고 기타 정상적인 생리 현상에 대한 부작용을 최소화하기 위하여 원하는 시간이나 국한된 조직에서 RNAi 발현을 조절할 수 있도록 shRNA inducible expression system을 구축하고자 하였다. 형질전환 동물을 대상으로 한 shRNA를 이용한 knock-down 전략의 응용은 약 10년 전에 최초로 시도되었는데 대부분의 시도가 porcine endogenous retrovirus (PERV)의 발현을 억제하는 형질전환 돼지를 생산하려는 연구들이었다(Karlas 등, 2004; Ramsoundar 등, 2009). 따라서 shRNA를 이용한 소형화된 동물을 생산하고자 하는 시도는 국내외를 막론하고 전무한 실정이다. 국내의 애완용 동물에 관한 시장 조사 및 통계 자료는 현재까지 명확하게 보고된 바가 없다. 대략적인 통계에 따르면 현재 국내 애완동물 관련 시장 규모는 2조 원에 달하며 2020년 기준으로 5조 8,000억원에 이를 것으로 추정하고 있다. 애완동물을 기르는 가구 비율은 국내 총 1,500만 가구 중 17% 가량의 가구가 애완동물을 기르고 있는 것으로 나타났으며 이를 인구로 환산하면 800~1,000만 명의 사람들이 애완동물과 함께 생활하고 있는 것이다. 이는 1인 가구의 증가와 저출산 및 고령화 등으로 애완동물의 수요가 증가하였음을 보여주고 있다. 국내 애완동물의 수는 700만 마리 정도로 추정되는데 그 중 개가 가장 많은 수를 차지하고 있으며 기타 애완동물에는 고양이, 조류, 토끼, 햄스터 등이 있고, 최근에는 설치류와 파충류 등도 애완동물의 범위에 포함되고 있다.



출처:농업경제연구소(2013), 애완동물 관련 시장 동향과 전망

관세청의 발표에 따르면 최근 애완동물의 수입 규모는 2009년 상반기 330만 달러보다 22.9% 증가한 409만 달러를 기록하였다. 종별로는 애완견의 비중이 가장 컸으며 이구아나나 카멜레온, 도마뱀, 패릿 등의 이색 애완동물의 비중이 급증하였다. 이에 본 연구에서 개발하고자 하는 애완용 미니 닭은 수입되는 이색 애완동물을 대체할 수 있는 충분한 상품적 가치를 가질 것으로 예상된다.



출처 : 관세청(2010), 애완동물 수입 트렌드

국내뿐만 아니라 국외에서도 애완동물 시장이 급증하고 있는데, American Veterinary Medical Association에 의하면 2007년 기준 미국 전체 가구의 37.2%가 개를, 32.4%가 고양이를 키우는 것으로 집계되었다. 미국의 애완용품 시장은 2009년 기준으로 454억 달러에 달하는 것으로 보고되었으며 이 중 애완동물의 구매를 위한 시장 규모는 22억 달러에 이른다.

< 2007년 미국 애완동물 보유현황 >

	개	고양이	조류	말
애완동물 보유율	37.2%	32.4%	3.9%	1.8%
애완동물 보유 가구수	43,021,000	37,460,000	4,453,000	2,087,000
가구당 평균 보유수(마리)	1.7	2.2	2.5	3.5
미국내 총 마릿수	72,114,000	81,721,000	11,199,000	7,295,000

출처 : American Veterinary Medical Association

일본은 소자화(출산을 꺼려해서 자녀 수가 적은 현상)·고령화·단독세대 증가 등으로 사회 환경이 변화하면서 '애완동물을 통한 심리적인 안정·치유'를 바라는 경향이 더 높아져 애완동물 관련 시장을 꾸준히 성장할 것으로 예상되고 있다. 펫후드 공업회가 실시하고 있는 전국 개·고양이 사육율 조사 결과에 따르면, 2007년도 사육 수는 개가 1252만 2000마리, 고양이가 1018만 9000마리로 전 인구의 10%가 애완동물을 기르고 있다. 통계를 개시한 1994년 이후 지속적으로 증가하고 있으며 애완동물 관련 시장의 규모는 1조엔 규모인 것으로 알려져 있다. 2010년 중국의 애완동물 수는 약 1억5000만 마리로 추산되며, 2009년에 비해 4000만 마리가 증가하는 등 그 수가 빠르게 늘고 있다. Euromonitor에 의하면 중국 내 애완동물이 2004년부터 2019년까지 15년 동안 빠르게 증가할 것이며, 애완동물 관련 산업도 빠른 성장을 지속할 것이라고 전망하고 있다. 2012년 애완동물 산업 규모는 200억 위안에 이르는 것으로 알려졌다. 본 과제에서 개발하고자 하는 애완용 미니 닭은 현재까지 이와 유사한 사례가 전무한 실정으로 산업화적 기대효과를 수치화하기가 거의 불가능한 실정이다. 따라서 다음과 같은 기준으로 기대효과를 산출하였다.

- 직접 경제효과의 산출 근거 : 말레이시아의 미니 닭의 마리당 가격이 약 U\$ 5,000 (약 600만원)을 기준으로 형질전환 미니 닭의 병아리 한 마리 가격을 보수적으로 어림잡아 약 100,000원으로, 초년도 국내수요 1,000마리, 시장의 연 성장률을 100%로 예상하였음.
- 경제적 파급효과 : 미니 닭 병아리의 생산 가격을 판매가의 40% (40,000원)로 계산하여 생산 원가를 제외하고 병아리 한 마리당 60,000원의 농가 소득이 발생할 것으로 예상함.
- 부가가치 창출액 : 특허권, 수출 효과를 감안하여 부가가치 창출액을 직접 경제 효과의 10배로 산정하였음.

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	400	800	1,600	3,100
경제적 파급효과	60	120	240	480	960	1,860
부가가치 창출액	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000	31,000
합 계	1,160	2,320	4,640	9,280	18,560	35,960

제 2 절. 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

유전공학을 이용한 동물을 소형화하는 연구는 세계적으로 처음으로 시도하는 독창적 연구이다. 본 연구에서는 GH, GHR, 그리고 IGF-1의 발현 억제에 의한 개체의 생리적인 부작용 발생이 우려되어 tetracycline-inducible promoter (Gossen 등, 1995)를 이용하여 발현 시기를 유도적으로 조절이 가능하도록 함으로써 이러한 부작용을 최소화하려고 하였다. 또한 본 연구에서 사용하고자 하는 tetracycline-inducible vector system의 성공 가능성은 본 연구진이 돼지와 닭에서 이미 확인하였다(Jin 등, 2014; Koo 등, 2010). 본 연구에 있어서 가장 중요한 핵심은 성장에 관여하는 유전자의 발현을 어떻게 조절하느냐에 있다. 따라서 현재까지 발표된 분자생물학적 연구 결과를 세포 수준이 아닌 하나의 완전한 동물개체 수준에서 적용하여 도출된 결과는 사람의 유전자 치료 분야에 직접적으로 응용될 수 있다. 동물의 성장에는 GH이나 IGF-1, 그리고 이들 호르몬에 대한 수용기 등이 관여한다고는 알려지고 있으나(Lupu 등, 2001) 이들 각각에 대한 정확한 생리학적 기전은 현재까지 많이 알려져 있지 않다. 또한 이러한 인자들을 knock-out 또는 knock-down하는 연구도 10여 년 전부터 진행되어 왔으나 이를 직접 적용하여 새로운 산업에 기여할 수 있는 기술은 거의 개발되지 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서 구축한 성장관련 유전자의 발현을 억제하는 shRNA vector system과 이를 이용하여 개발한 형질전환 미니 닭은 성장과 관련된 의학적 연구 및 제약 등 여러 산업 분야에 중요한 연구 모델로도 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

애완용 미니 닭의 개발에 있어서 중요한 기술은 성장 관련 유전자의 발현을 knock-down할 수 있는 shRNA를 design하여 유도적인 발현 조절이 가능한 tetracycline inducible expression system (Gossen과 Bujard, 1992; Gossen 등, 1995)에 도입하는 것과, 고감염성의 virus를 이용하여 형질전환 닭을 생산한 후 계통을 확립하여 품종을 고정하는 것이다. 전자의 shRNA 서열의 확보 및 Tet system의 도입은 타 연구에서도 만족스러운 결과를 도출한 경우가 없으므로 본 연구에서의 shRNA 서열을 도입한 Tet system의 구축 및 발현 확인은 여러 측면에서 유용한 연구 수단으로 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 실제적으로 원하는 유전자의 knock-down의 유도적인 조절을 식이를 통한 tetracycline의 공급 여부로 가능하게끔 design하였기 때문에 동물 윤리적 측면에서 제기될 수 있는 여러 문제의 가능성을 최소화하였다. 즉, tetracycline을 투여하지 않을 경우 닭의 생리에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 예상되며 오직 tetracycline을 공급한 닭에서만 소형화의 효과가 예상된다. 현재 상업화가 된 형광 유전자가 발현되는 형질전환 관상용 어류의 예를 볼 때, 본 과제에서 생산될 소형 닭의 상업화에는 별 다른 문제점이 없을 것으로 판단된다.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

D-05

제 1 절. 연구개발의 이론적, 실험적 접근방법

1. 연구개발 추진 전략 및 방법

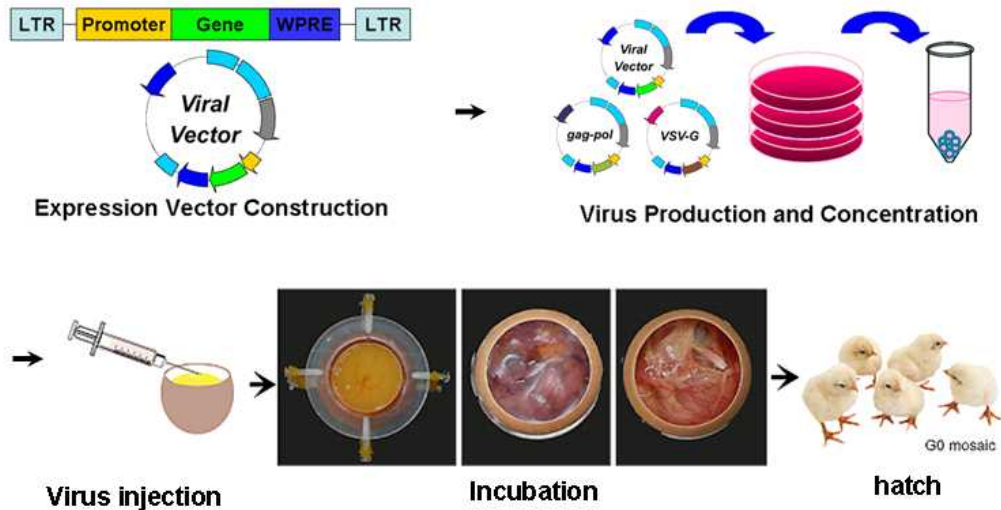
가. 추진 전략

본 연구 책임자는 1997년부터 지난 20여 년간 한국동물번식학회 집행부의 여러 업무를 수행하고 있으며, 동 분야의 국내 전문가는 물론 국제적인 전문가들과 지속적인 교류를 가지고 있어서 첨단 기술 정보의 수집이 용이하다. 본 연구실은 분자생물팀, 세포 및 virus 생산팀, 동물실험팀으로 이루어져 있으며 각각의 팀별로 전문 인력 연구원들이 효율적인 연구 진행이 가능하도록 긴밀한 협조 하에 연구를 진행하고 있다. 또한 일주일에 1회 이상의 lab meeting을 통하여 실험 전반에 대한 진행 사항을 보고하고 서로 의견을 교환함으로써 연구가 보다 원활하게 이루어질 수 있도록 하고 있다. 뿐만 아니라 100여 평의 계사 시설과 여러 실험 분야별 연구실을 보유하고 있어서 효율적인 연구 진행에 적절한 조건을 갖추고 있다. 이러한 인력과 시설을 이용하여 본 연구에서는 형질전환 기술을 이용하여 애완용 소형 닭의 개발을 수행하고자 하였다. 그 첫 번째 단계로 소형 닭의 생산을 위하여 동물의 체성장과 관련된 주요 유전자의 발현을 억제하기 위한 shRNA를 확보하고 이를 virus vector system에 도입하고자 하였다. 분자생물팀을 주축으로 체 성장에 관여하는 유전자인 IGF-1과 GH receptor, 그리고 GH의 발현을 억제하기 위하여 shRNA 기술을 도입한 vector system을 구축하고자 하였으며, 각 유전자에 대한 shRNA의 발현을 유도적, 조직특이적으로 한정하기 위하여 tetracycline-inducible expression system (Tet system)과 조직특이적 promoter를 vector 상에 도입하였다. 각 shRNA의 효율성에 대한 *in vitro* 검정과 동시에 세대 간격이 짧아서 단시간 내에 생산이 가능한 형질전환 mouse를 제작을 통한 *in vivo* 검정 시도는 세포 및 virus 생산팀과 동물실험팀에서 진행하였다. 또한 구축한 각각의 GH receptor shRNA와 GH shRNA, 그리고 IGF-1 shRNA가 Tet system 상에 도입된 virus vector system을 이용하여 고농도의 virus를 생산한 후, 이 virus를 수정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 생산한 제1세대 형질전환 닭의 정자에서 genomic DNA PCR 방법을 통해 외래 유전자의 전이가 확인된 개체는 wild type의 암탉과 교미하여 제2세대(G1) 형질전환 닭을 생산하였다. 제2세대 형질전환 닭을 대상으로 Tet system에 의한 체성장 관련 유전자의 발현을 억제하는 shRNA의 효율성을 검정하고자 하였다.

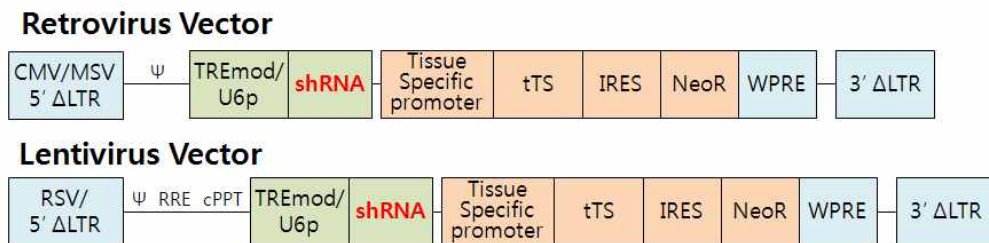
나. 추진방법

- 본 연구에서는 이사브라운, 레그혼 닭, 본 연구자가 개발한 녹색 형광 닭, 그리고 한국 재래종 관상용 닭인 실키 오골계를 공시동물로 사용한다.

- 형질전환 닭을 생산하기 위해서는 갓 산란한 유정란(발생학적으로 stage X 단계)의 배반엽 층에 고농도의 virus를 주입한 후 대리난각을 이용하여 배양한다. 그 일련의 과정은 다음의 그림과 같다.



- 구축하고자 하는 retrovirus와 lentivirus의 대강의 구조는 다음과 같다.



* CMV/MSV 5'LTR, Cytomegalovirus promoter/Murine sarcoma virus 5' long terminal repeats; Ψ, packaging site; TREmod/U6p; Tet responsive element/U6 promoter, shRNA, short-hairpin RNA; tTS, Tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; NeoR, neomycin resistance gene, 3' ΔLTR, 3' self-inactivating long terminal repeats; RSV/5'LTR, Rous Sarcoma virus 5' long terminal repeats; RRE, Rev response element; cPPT, central polypurine tract.

* shRNA-coding 유전자와 조직특이적 promoter의 종류에 따라 수십 종류의 vector를 구축하고자 한다.

- 형질전환 닭에 대한 검정

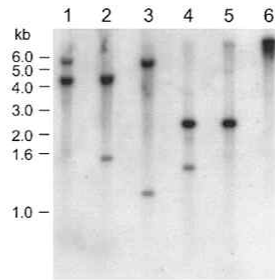
(i) 분자생물학적 방법

- Genomic DNA PCR : 본 연구에서 생산한 형질전환 개체의 외래 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 실시한다. 또한 여러 종류의 primer로 PCR을 실시하여 도입된 외래 유전자의 결실 여부를 검정한다.

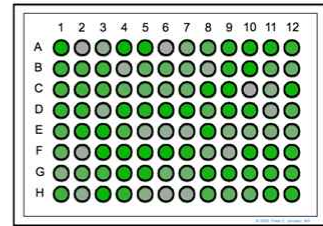
- Southern blot : Genome 내 삽입된 외래 유전자의 결실 여부와 전이된 유전자의 copy 수를 알기 위해서 실시한다.
- ELISA : Tetracycline의 공급 유무에 따라 성장 관련 유전자에 대한 shRNA의 발현이 조절되는지의 여부를 검정하기 위해서 성장 관련 인자에 대한 단백질 수준에서의 분석을 ELISA 방법으로 실시한다.



Blood Sampling



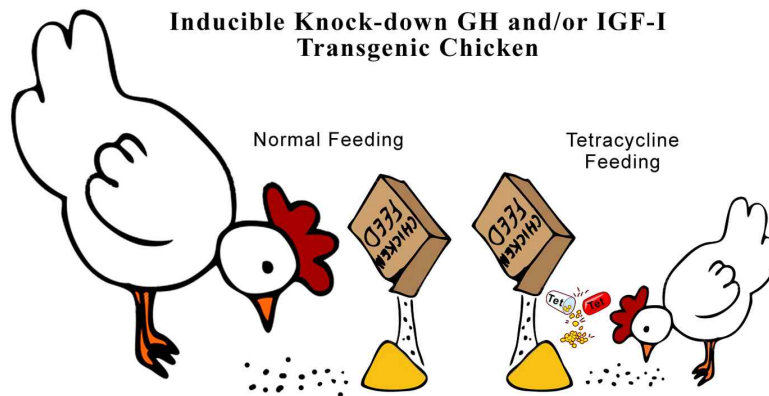
Blotting Analysis



ELISA

(ii) 생리학적 방법

- Tetracycline의 공급 여부에 따라서 체성장 관련 호르몬에 대한 shRNA에 의한 성장 억제 양상을 확인하기 위하여 호르몬 수치나 체중 변화 등의 생리학적인 검정을 실시한다.



2. 연구개발 추진체계

본 연구의 추진체계를 요약하면 아래의 그림과 같다.



3. 연구개발 추진일정

연차	연구목표	세부연구내용	월 단위 추진계획											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1차년도 (2011)	cGHR과 cIGF-I의 발현을 저하시킬 수 있는 retrovirus vector system의 개발 및 <i>in vitro</i> 검정	cGHR과 cIGF-I의 발현을 저하시킬 수 있는 retrovirus vector system의 개발												
		cGHR shRNA와 cIGF-I shRNA 발현에 의한 knock-down 효과의 <i>in vitro</i> 검정												
2차년도 (2012)	cIGF-1 shRNA가 도입된 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산 및 cGH shRNA 발현을 위한 virus vector의 구축	cIGF-1 shRNA 도입된 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산												
		germline transmission 여부 확인												
		cGH 유전자의 발현을 저하시키기 위한 cGH shRNA 제작 및 virus vector의 구축												
		개발한 virus vector를 이용한 cGH shRNA가 도입된 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산												
3차년도 (2013)	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형 형질전환 닭의 생산 및 다음세대(G1과 G2) 생산 시도	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형 형질전환 닭의 생산												
		생식세포로의 shRNA 서열이 전이된 1세대(G0) 형질전환 닭의 선별												
		2세대(G1) 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석												
		3세대(G2) 형질전환 닭의 생산 시도												

연차	연구목표	세부연구내용	월 단위 추진계획											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4차년도 (2014)	형질전환 미니 닭의 분자생물학적 검정 및 2세대 미니 닭의 생산	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형형질전환 닭의 추가 생산												
		생식세포로의 shRNA 서열이 전달된 1세대(G0) 형질전환 닭의 선별												
		2세대(G1) 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적, 생리학적 검정												
		녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 소형화												
5차년도 (2015)	형질전환 미니 닭의 계통 확립 및 대량 번식	3세대(G2) 형질전환 닭의 생산												
		2세대 및 3세대 형질전환 애완용 미니 닭의 분자생물학적, 생리학적 검정 및 번식 육종												
		녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 소형화를 통한 고부가가치 애완용 미니 닭의 생산												
		애완용 미니 녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 분자생물학적 분석 실시												

제 2 절. 연구내용 및 결과

본 연구에서는 닭의 소형화를 위한 vector system의 개발과 이를 이용한 형질전환 소형 닭의 생산을 수행하였다. 전자의 연구에서는 체성장에 관여하는 유전자인 IGF-1과 GH receptor, 그리고 GH의 발현을 억제하기 위하여 shRNA 기술을 도입한 vector system을 구축하고자 하였으며, 각 유전자에 대한 shRNA의 발현을 유도적, 조직특이적으로 한정하기 위하여 tetracycline-inducible expression system과 조직특이적 promoter를 vector 상에 도입하였다. 형질전환 소형 닭의 생산에 사용할 체성장 억제 인자인 IGF-1 shRNA와 GH receptor shRNA의 효율성에 대한 *in vitro* 검정과 동시에, 세대간격이 짧아서 단시간 내에 생산이 가능한 형질전환 mouse를 제작하여 *in vivo* 검정도 실시하고자 하였다. 뿐만 아니라 GH receptor, GH, 또는 IGF-1 유전자에 대한 각각의 shRNA가 Tet system 상에 도입된 virus vector system을 이용하여 형질전환 닭의 생산을 시도하고자 하였다. Virus vector system을 이용한 형질전환 닭 생산은 지금까지 보고된 방법 중 가장 보편적이고 효율적인 방법으로서 본 연구실에서도 이 system을 이용하여 다수의 형질전환 닭을 개발하였다(Koo 등, 2006; Kwon 등, 2008; Koo 등, 2010). 성장 억제를 위한 shRNA가 도입된 형질전환 닭은 분자생물학적, 생리학적 분석을 실시하였으며 계통 확립을 위한 차세대 개체들의 생산도 진행하였다.

1. 체성장 관련 유전자의 발현 억제를 위한 vector system의 구축

가. 조직특이적 promoter의 확보 및 *in vitro* 검정

(1) GHRHR promoter

Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) 유전자의 발현을 조절하는 GHRHR promoter는 뇌하수체 전엽 특이적인 promoter이다(Peterssen 등, 1998). GHRHR promoter의 cloning은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. Rat의 뇌하수체로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 5' -ATCCAGTAAGTAGCATTCTCCATG-3' 와 5' -TGCCTGTAGTCCGCCCAAAGAGC-3' 의 primer로 PCR 반응을 수행하였으며, 1970 bp의 DNA band를 증폭하였다. PCR 반응으로 증폭된 단편을 pRBC-T&A plasmid에 도입하였으며 이후 DNA sequencing을 실시하여 1970 bp의 GHRHR promoter를 확인하였다. 확보한 GHRHR promoter의 조직 특이적인 발현을 검정하기 위하여 promoter의 3' 위치에 표지유전자인 EGFP 유전자를 결합시킨 후 pLNPXW와 재조합하여 pLNRGHRHRpGW를 완성하였다(Fig. 1). 본 vector는 EGFP 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional element (WPRE) (Zufferey 등, 1999) 서열이 도입된 구조이다.

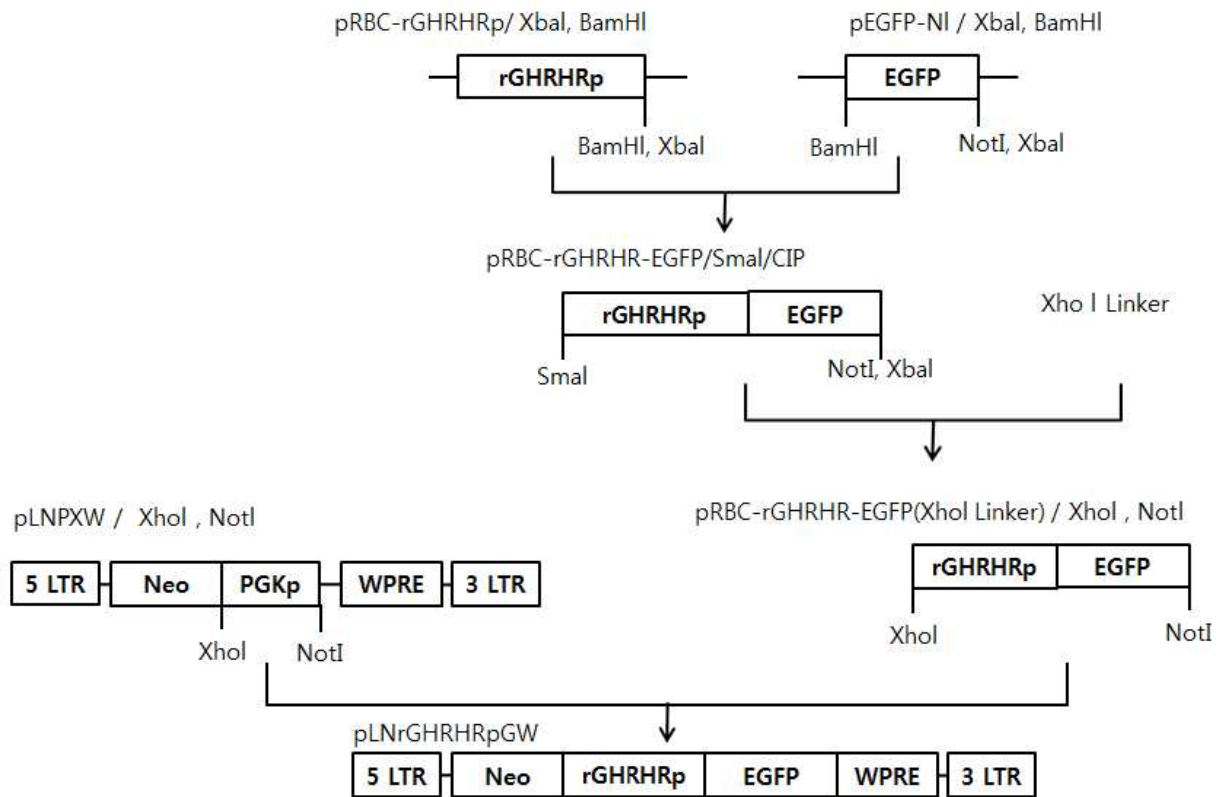


Fig. 1. Strategy of pLNrGHRHRpGW retrovirus vectors. rGHRHRp, rat growth hormone-releasing hormone receptor promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; PGKp, phosphoglycerate kinase-1 promoter; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

GHRHR promoter의 조직특이적인 활성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 구축한 pLNrGHRHRpGW vector를 PT67 세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 600 µg/ml의 G418이 첨가된 배양액에서 2주간 배양한 후 이 세포의 배양액을 수확하여 GP2 293 세포에 감염시켰다. 감염된 GP2 293 세포를 600 µg/ml의 G418이 첨가된 배양액에서 2주간 배양하여 virus 생산 세포주인 GP2 293-LNrGHRHRpGW를 확립하였다. 이 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 virus를 생산한 후 동일한 particle 수의 virus를 다양한 표적세포에 감염시켰다. 표적세포로는 쥐의 뇌하수체 세포인 GH3, 사람의 배아 신장 세포인 293, 쥐의 간세포인 Hepalcl7, 그리고 생쥐의 배아 섬유아세포인 NIH3T3를 사용하였으며, virus 감염시 감염 촉매제인 polybrene (5 µg/ml; Sigma, USA)을 첨가하였다. Virus를 감염시킨 각 세포들은 600 µg/ml의 G418이 첨가된 배양액에서 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포만을 선별하였다. 선별된 표적세포에서 외래 유전자의 전이 여부를 확인하기 위하여 표지 유전자인 EGFP 유전자의 발현을 RT-PCR과 형광현미경 관찰 방법으로 확인하고자 하였다.

RT-PCR은 TRI reagent (TaKaRa, Japan)를 처리하여 세포내 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA로부터 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로 *EGFP* 유전자 및 *WPRE*, 대조구인 *mGAPDH* 유전자의 전사 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였으며 사용한 primer 서열은 표 1과 같다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 방치한 후, 94°C에서 30초(denaturation), *EGFP*와 *WPRE*는 57°C, *mGAPDH*는 54°C에서 30초(annealing), 그리고 72°C에서 30초(extension)의 반응을 35회 반복 실시하였고 72°C에서 7분간 방치하여 완전한 extension을 유도하였다.

Table 1. Primers used for RT-PCR analysis of LNrGHRHRpGW and LNrGHpGW infected target cells

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
EGFP	5'- GACTTCAAGGAGGACGGCAACA-3' (+) 5'-TCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAG-3' (-)	256	57
WPRE	5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' (+) 5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)	315	57
Neo	5'-GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGG-3' (+) 5'-GCGATACCGTAAAGCACGAGGAA-3' (-)	494	57
mGAPDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACT-3' (+) 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTTGC-3' (-)	230	54

RT-PCR 결과, virus가 감염되지 않은 정상세포에서는 GAPDH 서열에 대한 증폭 단편만 확인된 데 비해서 virus가 감염된 표적세포들에서는 *EGFP*, *WPRE*, 그리고 대조구인 *GAPDH* 서열에 대한 증폭 단편이 모두 확인되었다(Fig. 2).

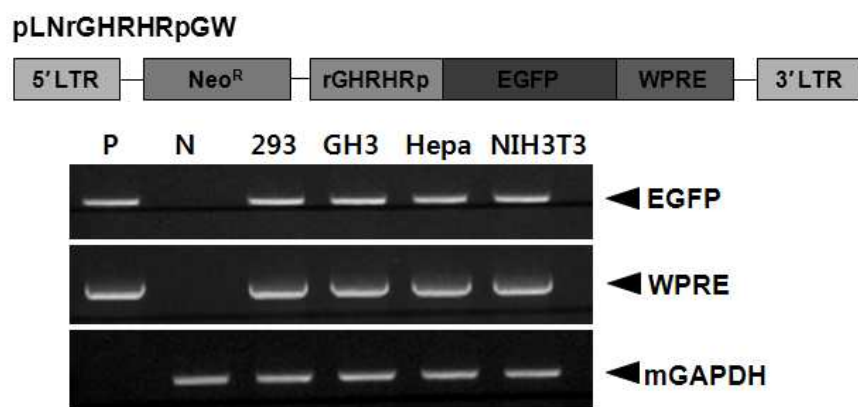


Fig. 2. RT-PCR analyses of LNrGHRHRpGW virus infected various target cells.

Virus에 감염된 여러 표적세포에서 표지 유전자인 EGFP의 발현 여부를 형광현미경 하에서 관찰하고자 하였다. 그 결과, 쥐의 뇌하수체 세포인 GH3 세포에서만 강한 형광이 확인되었으며 사람의 배아신장세포인 293이나, 쥐의 간세포인 Hepalclc7, 그리고 생쥐의 배아섬유아 세포인 NIH3T3에서는 형광이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). 결과적으로, RT-PCR에서는 모든 표적세포주에서 EGFP 유전자와 WPRE 서열에 대한 증폭 단편이 확인되었는데 반해 형광현미경 하에서는 쥐의 뇌하수체 세포인 GH3 세포에서만 EGFP 유전자의 발현에 의한 형광이 강한 것으로 확인되었다. 이는 virus vector system에 의해 외래 유전자의 전이는 정상적으로 일어났으나 단백질 수준에서의 발현은 뇌하수체 세포주에서만 국한되어 일어났음을 의미하는 것이다. 따라서 GHRHR promoter가 외래 유전자의 발현에 있어서 조직특이적인 promoter로 사용할 수 있을 것으로 판단하였다.

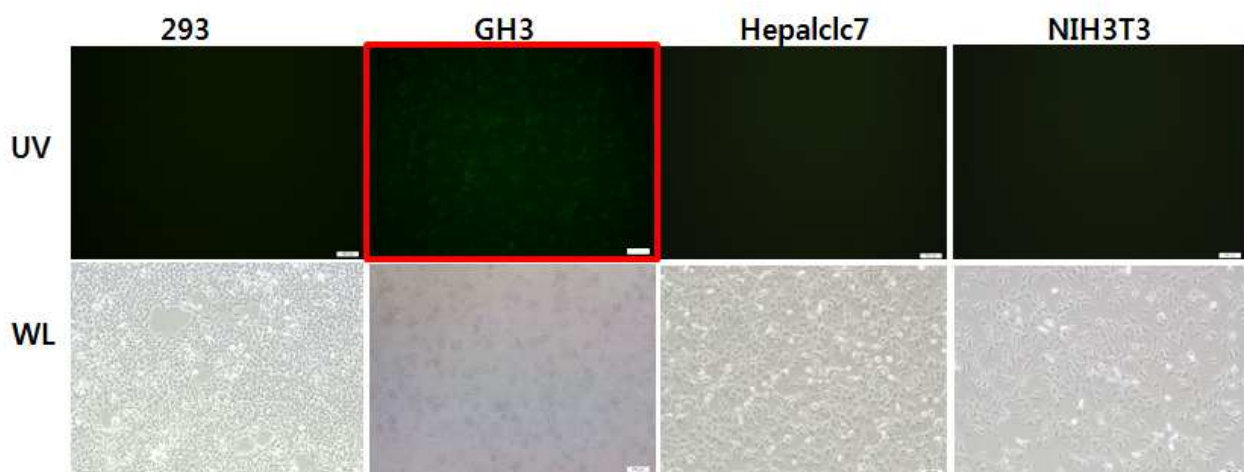


Fig. 3. Expression of the EGFP gene in LNrGHRHRpGW virus infected various target cells using fluorescent microscopy. The symbols at the left side indicate the white light (WL) or fluorescence (UV).

(2) GH promoter

또 하나의 뇌하수체 전엽 특이적 promoter인 growth hormone (GH) promoter (Dana와 Karin, 1989)는 닭의 GH promoter (cGH promoter)와 쥐의 GH promoter (rGH promoter)를 모두 확보하고자 하였다. 먼저 cGH promoter의 cloning 과정은 다음과 같다. 닭의 뇌하수체로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 5' -ATTTCTGCGTGGTGTAAAGCGCTC-3' 와 5' -TCCTGCCGGGAGAGTTGCTCAGGT-3' 의 primer로 PCR 반응을 수행하였으며, 1871 bp의 DNA band를 증폭하였다. PCR 반응으로 증폭된 단편을 전 단계에서 cloning한 pLNrGHRHRpGW의 rGHRHR promoter 부분과 중복되는 제한효소 절단 부위를 제거하고 cGH promoter를 도입하여 pLNCGHpGW를 완성하였다(Fig. 4).

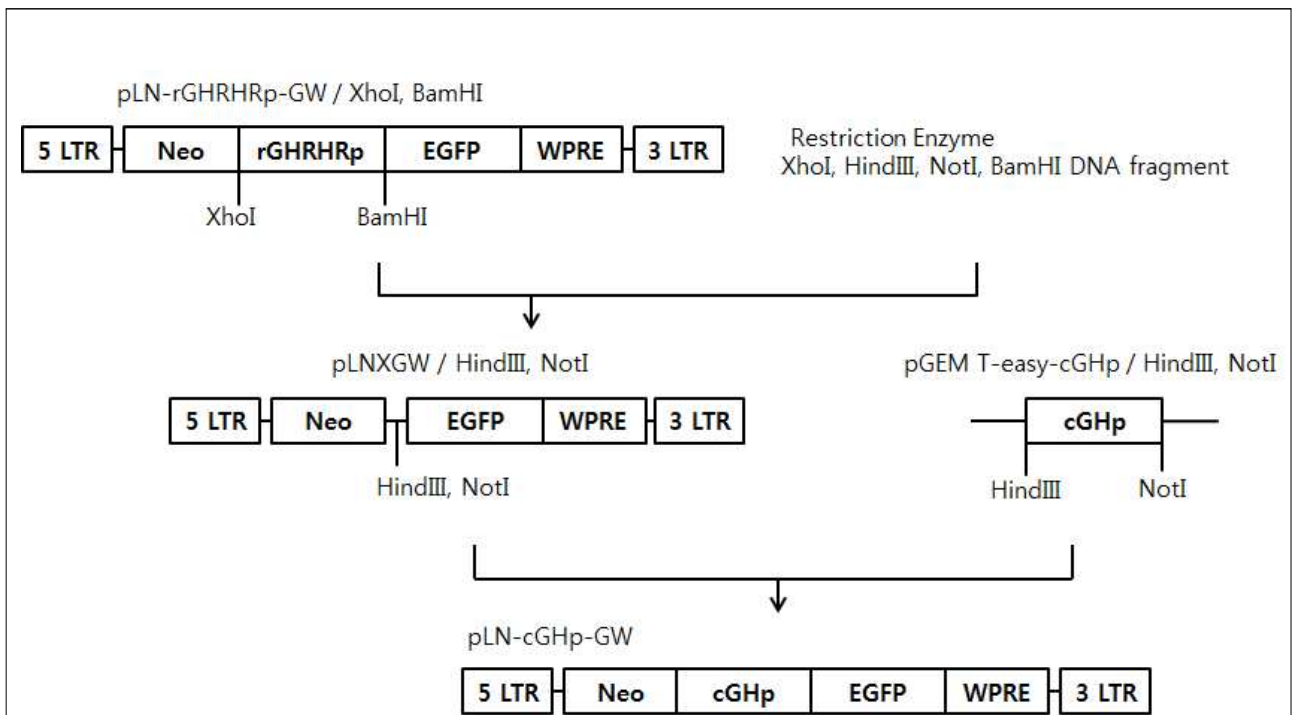


Fig. 4. Strategy of pLNcGHpGW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo^r, neomycin resistant gene; rGHRHRp, rat growth hormone-releasing hormone receptor promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; cGHp, chicken growth hormone promoter. Length of each sequence is not drawn to scale.

rGH promoter의 확보도 cGH promoter와 유사한 과정으로 진행되었다. 쥐의 뇌하수체로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 5' -AAGCTTAGTTTCTAGTAGGAAT-3' 와 5' -CGCCACTCAGTGATCTGTCCAC-3' 의 primer로 PCR 반응을 수행하였으며, 1834 bp의 DNA band를 증폭하였다. 확보한 rGH promoter의 조직 특이적인 발현을 검정하기 위하여 전단계에서 cloning한 pLNcGHpGW의 multi cloning site에 rGH promoter를 도입하여 pLNrGHpGW를 구축하였다. 자세한 cloning 과정은 Fig. 5에 나타내었다.

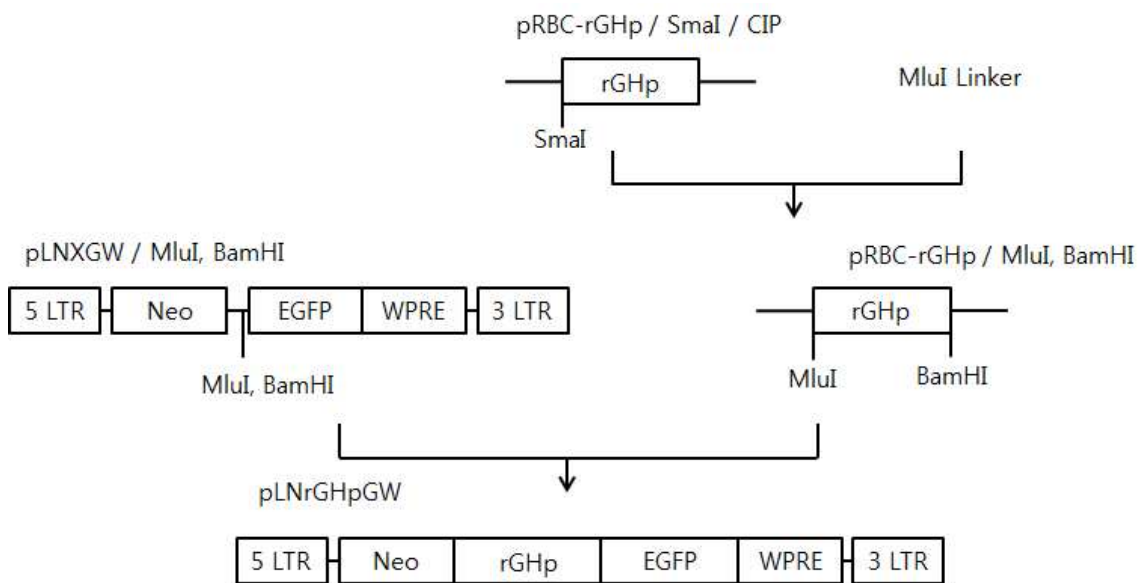


Fig. 5. Strategy of pLNrGHpGW retrovirus vector. rGHp, rat growth hormone promoter; LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; rGHRHRp, rat growth-hormone-releasing hormone receptor promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

두 종류의 GH promoter 중 rGH promoter의 활성 확인을 위한 *in vitro* 검정 실험을 실시하였다. 본 실험은 GHRHR promoter 관련 실험과 동일한 과정으로 진행하여 LNrGHpGW virus를 생산하였으며, 이 virus를 GH3와 NIH3T3에 감염시켰다. 감염된 각 세포주에서 EGFP 유전자의 보다 정확한 발현 양상 확인을 위하여 hormone induction 조건 여부에 따른 RT-PCR과 형광현미경 관찰, Western blotting을 실시하였다. Hormone induction은 감염된 각 세포주를 1×10^6 cells/100 mm dish로 준비하고, 다음 날 5 nM의 dexamethasone과 100 nM의 T3가 포함된 배지로 교환한 후 48시간 동안 배양하였다. RT-PCR은 GHRHR promoter 관련 실험과 동일한 과정으로 실시하였으며, PCR 반응시 EGFP 유전자와 Neo^R 유전자, 대조군인 mGAPDH에 대한 primer를 사용하였다(Table 1). RT-PCR 확인 결과 virus에 감염된 모든 세포주에서 Neo^R 유전자와 EGFP 유전자에 대한 증폭 단편이 확인되었으며, 대조군인 mGAPDH 유전자에 대한 증폭 단편은 virus 감염 여부와 관계없이 모든 세포주에서 확인되었다(Fig. 6).

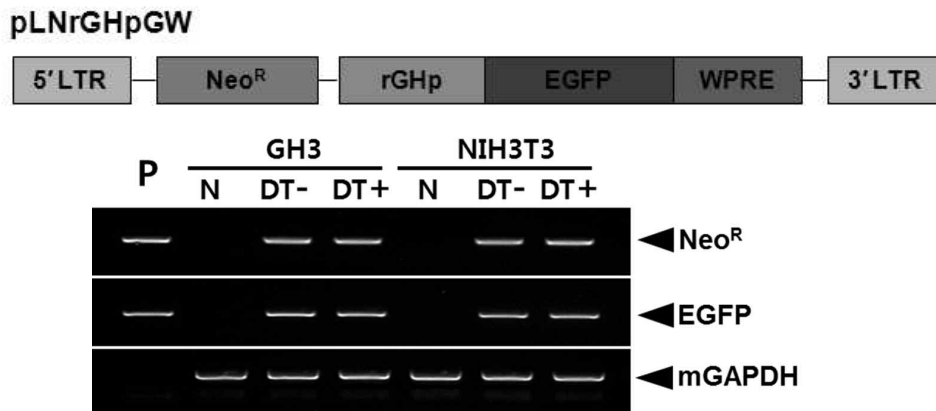


Fig. 6. RT-PCR analyses of the *EGFP* gene in LNRGHpGW virus infected GH3 and NIH3T3 target cells. The symbols at the top row, such as 'P', 'N', 'DT-', and 'DT+' indicate plasmid vector, uninfected cell, cell culture media supplemented without or with Dexamethasone and T3.

단백질 수준에서의 유전자 발현 분석은 Western blotting과 형광현미경 관찰 방법으로 실시하였으며, 이 중 Western blotting 과정은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 각 sample을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 80V의 전압으로 전기영동하여 Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad, USA)을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. 5%의 skim milk가 포함된 0.1%의 tween-20 blocking 용액으로 1시간동안 blocking하였으며, 1:4,000으로 희석한 anti-EGFP 항체(Clontech, USA)를 이용하여 16시간 동안 반응시켰다. 0.1% tween-20이 들어간 TBS-T로 membrane을 3회 수세하였고, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce, USA)를 1:4,000으로 blocking buffer에 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T용액으로 3회 수세하고 SuperSignal West Pico Substrate (Pierce, USA)를 반응시켜서 X-ray film에 현상하였다. 그 결과, 쥐의 배아섬유아세포인 NIH3T3 세포에 비해 쥐의 뇌하수체 세포인 GH3에서 강한 EGFP 발현을 나타내었으며 hormone induction 조건에 따라서 발현 유도 양상이 차이를 보이는 것으로 확인되었다. 즉 dexamethasone과 T3 호르몬이 처리된 조건에서 발현이 강해지는 것을 확인하였다(Fig. 7).

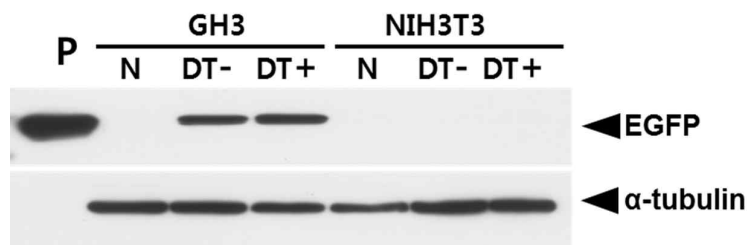


Fig. 7. Western blot analyses of the EGFP gene in LNRGHpGW virus infected GH3 and NIH3T3 target cells. The symbols at the top row, such as 'P', 'N', 'DT-', and 'DT+' indicate plasmid vector, uninfected cell, cell culture media supplemented without or with Dexamethasone and T3.

형광 현미경을 통한 관찰에서도 유사한 양상의 결과를 나타내었다. NIH3T3 세포에 비해 GH3에서의 형광이 강하게 발현되었으며 hormone이 없는 배지에서 배양된 세포보다 hormone이 공급된 조건에서 자란 세포에서 형광이 강한 것으로 확인되었다(Fig. 8). 따라서 확보한 GH promoter는 GH에 대한 shRNA 발현 vector 구성에 있어서 뇌하수체 조직 특이적인 발현을 위한 promoter로 이용할 수 있을 것으로 예상되었다.

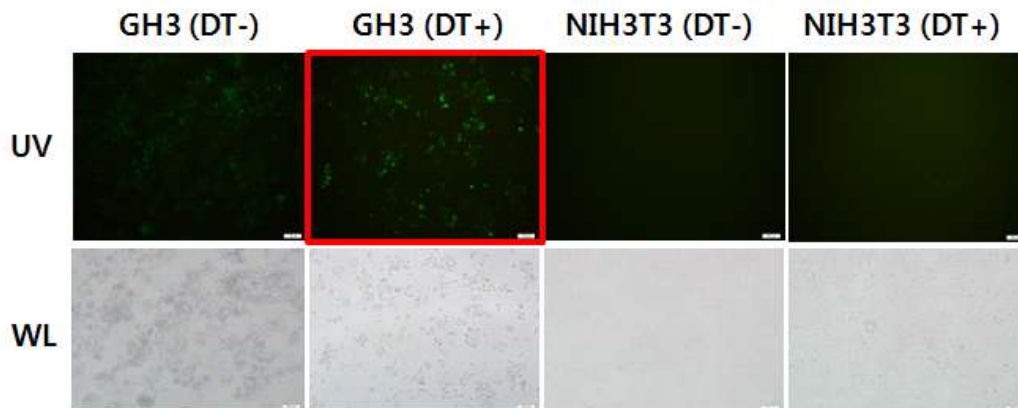


Fig. 8. Expression of the EGFP gene in LNrGHpGW virus infected various target cells using fluorescent microscopy. The symbols at the top row, such as 'DT-', and 'DT+' indicate cell culture media supplemented without or with Dexamethasone and T3. The symbols at the left side indicate the white light (WL) or fluorescence (UV).

(3) Albumin promoter

간 조직 특이적인 promoter인 albumin promoter는 본 연구실에서 보유 중인 pUC57-SV40 enh-Albumin(bor) promoter vector로부터 cloning하였다. 본 vector를 EcoR V와 Sal I 제한 효소로 처리하여 albumin promoter 부위를 절단해 낸 후, 이를 Ase I과 Mungbean Nuclease, Sal I 순으로 처리한 pEGFP-N I-W와 재조합하여 pAlbumin-EGFP-N I을 구축하였다(Fig. 9).

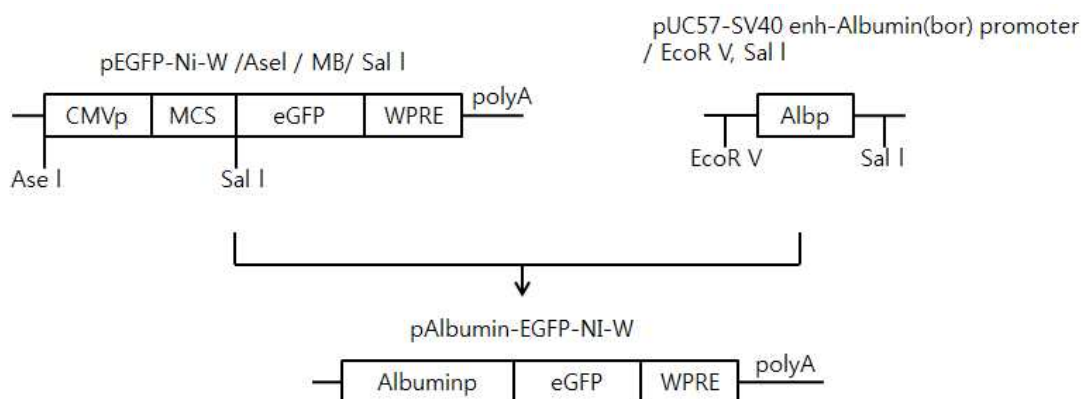


Fig. 9. Strategy of pAlbumin-EGFP-N I -W vector. CMVp, cytomegalovirus promoter; MCS, multicloning site; eGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Albp, Albumin promoter. Length of each sequence is not drawn to scale.

Albumin promoter의 조직 특이적인 활성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 구축한 pAlbumin-EGFP-N I -W를 chicken hepatoma cell인 LMH/2A 세포(ATCC CRL-2118)와 사람의 자궁경부암세포인 HeLa 세포, 그리고 CEF 세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 48시간 후 표지 유전자인 *EGFP* 유전자의 발현을 형광현미경 관찰 방법으로 확인하고자 하였다. 그 결과, chicken hepatoma cell인 LMH/2A 세포에만 형광이 강하게 확인되었으며 본 연구에서 확보한 albumin promoter를 간 조직 특이적인 promoter로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다(Fig. 10).

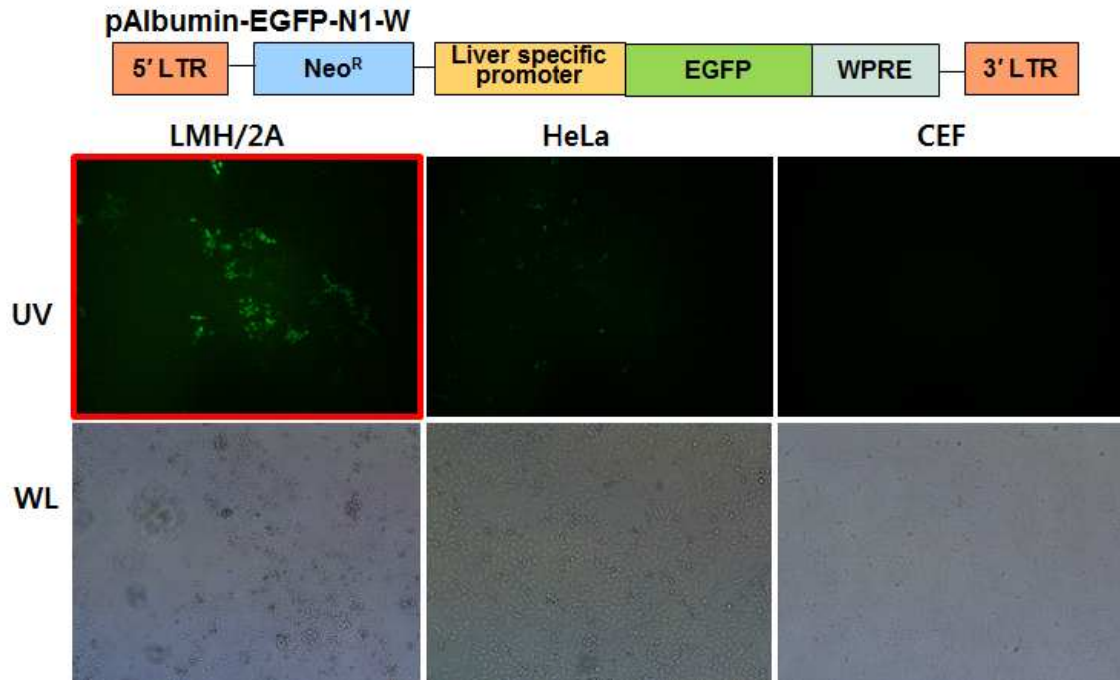


Fig. 10. Expression of the *EGFP* gene in pAlbumin-EGFP-N I -W transfected various target cells using fluorescent microscopy. The symbols at the left side indicate the white light (WL) or fluorescence (UV).

나. 형질전환 소형 mouse 제작을 위한 vector system의 구축

(1) Mouse IGF-1과 mouse GHR 유전자에 대한 shRNA 발현 vector system의 구축

(가) Mouse IGF-1과 mouse GHR 유전자에 대한 shRNA 제작

Mouse의 RNA 간섭 서열은 Clontech사의 온라인 프로그램인 RNAi Target Sequence Selector (http://www.clontech.com/KR/Support/xxclt_onlineToolsLoad.jsp?citemId=http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do§ion=16260&xxheight=1100)를 이용하여 design하였다. 닭의 경우와 마찬가지로 Clontech사의 RNAi Target Sequence Selector 및 shRNA Sequence Designer 프로그램을 통하여 결정하였다. Mouse의 체성장과 관련된 유전자 IGF-I (GenBank accession No. NM_010512.5)과 GHR (GenBank accession No. NM_010284.3)의 mRNA 서열을 RNAi Target Sequence Selector에 입력한 후 프로그램

을 실행하여 표적 서열을 도출하였다. mIGF-1의 경우 2개, mGHR의 경우 3개의 서열이 결정되었으며 그 서열은 표 3과 같다. 선택된 각 서열은 다시 Clontech사의 shRNA Sequence Designer (http://www.clontech.com/KR/Support/xxclt_onlineToolsLoad.jsp?citemId=http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/oligoDesigner.do?overhangs=on&restrictionSite=on§ion=6260&xxheight=750) 프로그램을 통하여 shRNA 발현 vector와 결합할 수 있는 형태로 design하였다(Table 2). 각 shRNA를 코딩하는 oligo nucleotide는 sense, loop, antisense 그리고 전사 중지 서열인 6 base의 poly T로 구성되어 있다.

Table 2. Designed shRNAs targeting the mRNA of mIGF-1 and mGHR genes

Target Gene	siRNA Target Sequence	shRNA Sequence
mouse IGF-I	mIGF-1 siRNA-342	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCTGTGACTTCTTGAAGATATTCAAGAGAT ATCTTCAAGAAGTCACAGTTTTTTACGCGTg-3'
	CTGTGACTTCTTG AAGATA	Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACTGTGACTTCTTGAAGAT ATCTCTTGAATATCTTCAAGAAGTCACAGCg-3'
	mIGF-1 siRNA-674	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCTGACATGCCCAAGACTCATTCAAGAGAT GAGTCTTGGGCATGTCAGTTTTTTACGCGTg-3'
	CTGACATGCCCA AGACTCA	Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACTGACATGCCCAAGACT CATCTCTTGAATGAGTCTTGGGCATGTCAGCg-3'
mouse GHR	mGHR siRNA-641	Top Strand (65bp) 5'-gatccGCATCAAGCTAACTACAAATTCAAGAGAT TTGTAGTTAGCTTGATGCTTTTTTTACGCGTg-3'
	GCATCAAGCTAA CTACAAA	Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGCATCAAGCTAACTACA AATCTCTTGAATTTGTAGTTAGCTTGATGCg-3'
	mGHR siRNA-1197	Top Strand (66bp) 5'-gatccGTCCAGATCTTCTCAAGGAATTCAAGAGAT TCCTTGAGAAGATCTGGATTTTTTTACGCGTg-3'
	TCCAGATCTTCTC AAGGAA	Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAATCCAGATCTTCTCAAGGA ATCTCTTGAATTCCTTGAGAAGATCTGGACg-3'
	mGHR siRNA-1358	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCAGACAGACTTCTAAGCAATTCAAGAGA TTGCTTAGAAGTCTGTCTGTTTTTTACGCGTg-3'
	CAGACAGACTTC TAAGCAA	Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACAGACAGACTTCTAAGC AATCTCTTGAATTGCTTAGAAGTCTGTCTGCg-3'

이상의 mouse의 shRNA 서열들은 pTetRNAi-ATINW vector에 cloning하여 유전자 발현 저해 효과를 검증하고자 하였다.

(나) pTetRNAi-mIGF1i-ATINW와 pTetRNAi-mGHRi-ATINW vector system의 구축

① pTetRNAi-mIGF1i-ATINW와 pTetRNAi-mGHRi-ATINW vector의 구축

Mouse shRNA 서열인 mIGF-1i와 mGHRi은 pTetRNAi-ATINW vector에 도입하였다. 각각 도입된 vector는 pTetRNAi-mIGF1i-ATINW와 pTetRNAi-mGHRi-ATINW로 명명하였으며 자세한 vector 구조는 Fig. 11과 같다.

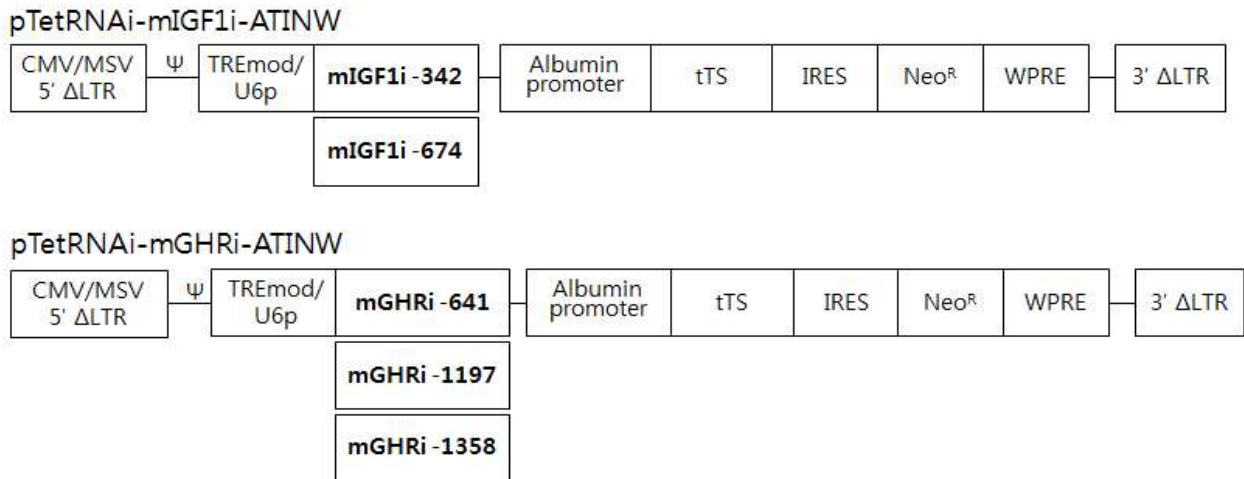


Fig. 11. Construction of pTetRNAi-mIGF1i-ATINW and pTetRNAi-mGHRi-ATINW retrovirus vectors. CMV/MSV LTR, cytomegalovirus/mouse sarcoma virus hybrid promoter long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; mIGF1i, mouse IGF-1 shRNA; Alb, albumin promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo^R, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; mGHRi, mouse GHR shRNA. Length of each sequence is not drawn to scale.

② mouse shRNA를 도입한 Tet vector system의 유전자 발현의 knock-down 효과 검증
 Mouse shRNA를 도입하기 전 생쥐의 간세포인 Hepa1c1c7 세포에 hGH 첨가에 따른 mIGF-1의 발현 양상을 ELISA 방법을 사용하여 *in vitro*에서 확인하고자 하였다. ELISA 실험은 R&D systems (USA)의 Mouse/Rat IGF-I ELISA kit을 이용하여 실시하였다. 96 well plate에 Calibrator Diluent RD5-38 buffer를 50 μl씩 넣은 후 준비된 sample과 standard를 50 μl씩 첨가하여 실온의 microplate shaker 상에서 2시간 반응시켰다. 반응 2시간 후 wash buffer로 4회 수세한 다음 100 μl의 conjugate를 각 well에 첨가하여 2시간 동안 실온의 microplate shaker 상에서 반응시켰다. 4회 수세한 각 well에 substrate 100 μl를 첨가하여 실온에 30분간 방치한 후, stop solution 100 μl를 넣고 반응을 종료하였다. 발색반응을 확인한 뒤 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과, Hepa1c1c7 세포 배양액에서의

mIGF-1의 수치가 115 ng/ml으로 나타난 데 비해 hGH가 첨가된 조건에서 자란 세포의 배양액에서 mIGF-1의 농도는 1,620 ng/ml로 14배 이상 높은 것으로 나타났다. Quantitative real-time PCR에서 mGAPDH 유전자에 대한 mIGF-1 유전자의 발현 정도를 상대적으로 분석한 결과 hGH media를 더한 Hepa1c1c7 세포에서 발현효율이 1.8배 정도 높게 나타났다 (Fig. 12). 따라서 생쥐의 간세포인 control Hepa1c1c7 세포에 hGH를 첨가시 mIGF-1 유전자의 전사 및 발현이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

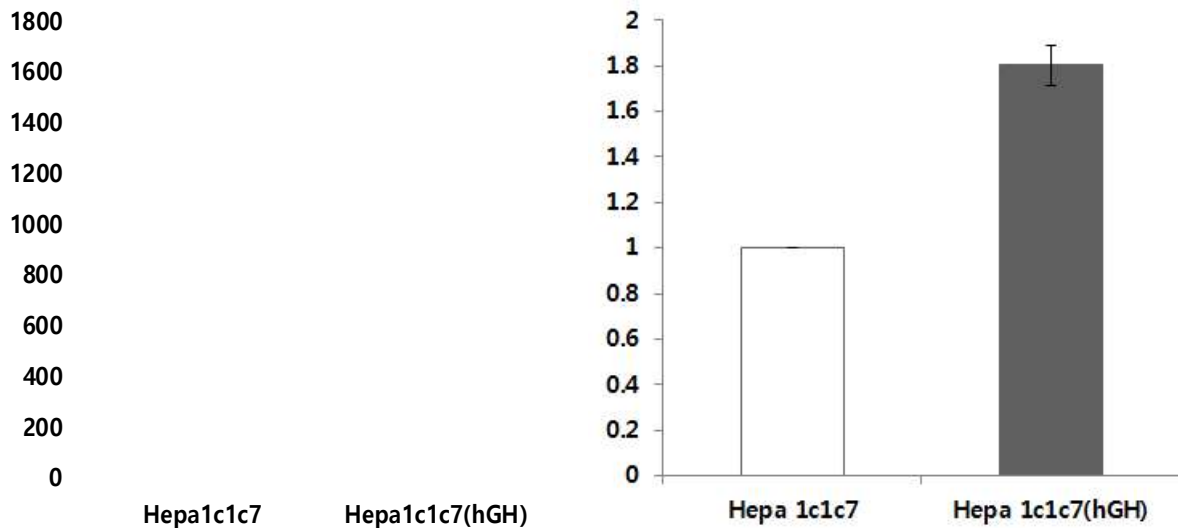


Fig. 12. Acceleration of mIGF-1 expression according to addition of hGH. Cells were grown in the media supplemented with or without hGH for 48 hrs.

pTetRNAi-mIGF1i-ATINW와 pTetRNAi-mGHRi-ATINW vector를 이용한 mIGF-1과 mGHR에 대한 shRNA를 세포 내로 전이시키기 위한 실험은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 먼저 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 각각의 vector와 피막 유전자인 VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)가 포함된 pVSV-G (Clontech, USA)를 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하였다. 48시간이 경과된 후 생산된 virus를 수확하여 Hepalcl7 세포에 각각 감염시켰으며 감염 촉매제인 polybrene (5 µg/ml; Sigma, USA)도 함께 첨가하였다. 이튿날부터 neomycin (600 µg/ml; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 virus vector가 전이된 세포주를 확립하였다. 본 실험에서 사용한 GP2 293과 Hepalcl7는 10%의 FBS (fetal bovine serum; HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. Hepalcl7-TetRNAi-mIGF1i-ATINW와 Hepalcl7-TetRNAi-mGHRi-ATINW 세포를 doxycycline (1 µg/ml)이 첨가된 배양액에서 72시간 동안 배양한 후 TRI reagent (TaKaRa, Japan)로 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다. mIGF-1과 mGHR 유전자 발현의 knock-down 여부를 확인하기 위하여 internal control인 mGAPDH와 함께 각각의 유전자에 대한 특이적인 PCR primer

로 quantitative real-time PCR을 수행하였으며 반응에 사용한 primer 서열은 다음과 같다 (Table 3). Bio-Rad 회사(USA)의 CFX96™ real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample을 4개씩 동시에 real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 2회 반복 실험하였다. PCR 반응은 IQ™ SYBR Green qPCR Master mix (Bio-Rad, USA) 10 μ l에 각각 5 pmol의 + 와 - strand primer, 그리고 cDNA template 30 ng을 넣어 전체 20 μ l로 수행하였다. Quantitative real-time PCR 결과를 CFX manager software로 분석하여 Ct값을 결정하였으며, Ct값에서 GAPDH 유전자의 Ct값은 reference로 정하고 mIGF-1과 mGHR 유전자의 Ct값을 target으로 정한 뒤 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법(Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 최종적으로 mIGF-1과 mGHR 유전자의 발현 정도를 비교하였다.

Table 3. Mouse shRNA primers used in real-time PCR analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)
mIGF-1	5'-CTTCTACCTGGCGCTCTGCTTG-3' (+) 5'-ATCACAGCTCCGGAAGCAACAC-3' (-)	208
mGHR	5'-TGAGGCACTTCAAAGTCTTGCC-3' (+) 5'-GTGCTCTTCCCACCTTGGATTT-3' (-)	223
mGAPDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACT-3' (+) 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTTGC-3' (-)	230

TetRNAi-mIGF1i-342, 674-ATINW 세포에서 mGAPDH 유전자에 대한 mIGF-1 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과 발현 억제 효율이 83.7%, 85.3% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었고(Fig. 13), doxycycline에 의한 mIGF-1 shRNA의 유도적 발현이 일어나서 mIGF-1 유전자 발현이 knock-down 되고 있음을 알 수가 있었다.

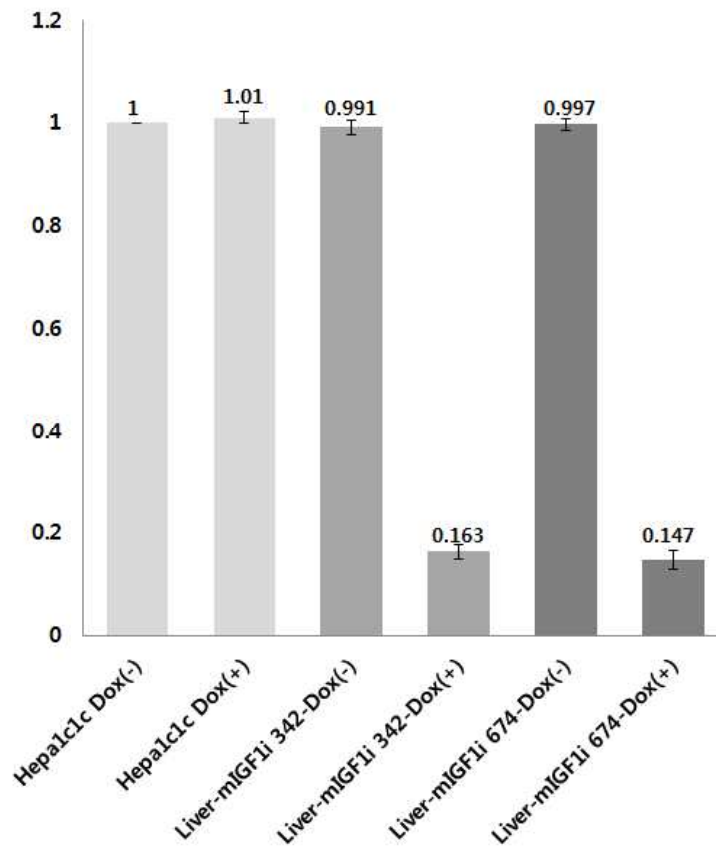


Fig. 13. Efficiency of mIGF-1 knock-down using mIGF1i shRNA in Hepalclc7-TetRNAi-mIGF1i-ATINW cells. Dox (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; Dox (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml) for 48 hrs.

TetRNAi-mGHR1i-641, 1197, 1358-ATINW 세포에서 mGAPDH 유전자에 대한 mGHR 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과 90.4%, 90.3%, 93.4% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 14). 또한 mGHR 유전자의 억제로 인하여 mGHR의 결핍이 유발되고 이로 인하여 세포 내의 mIGF-1의 합성에 영향을 미치므로 mIGF-1 유전자의 억제 효율 정도도 상대적으로 분석하였다. 그 결과 각각의 세포에서 86.7%, 88.9%, 91.9% 정도의 mIGF-1 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 14).

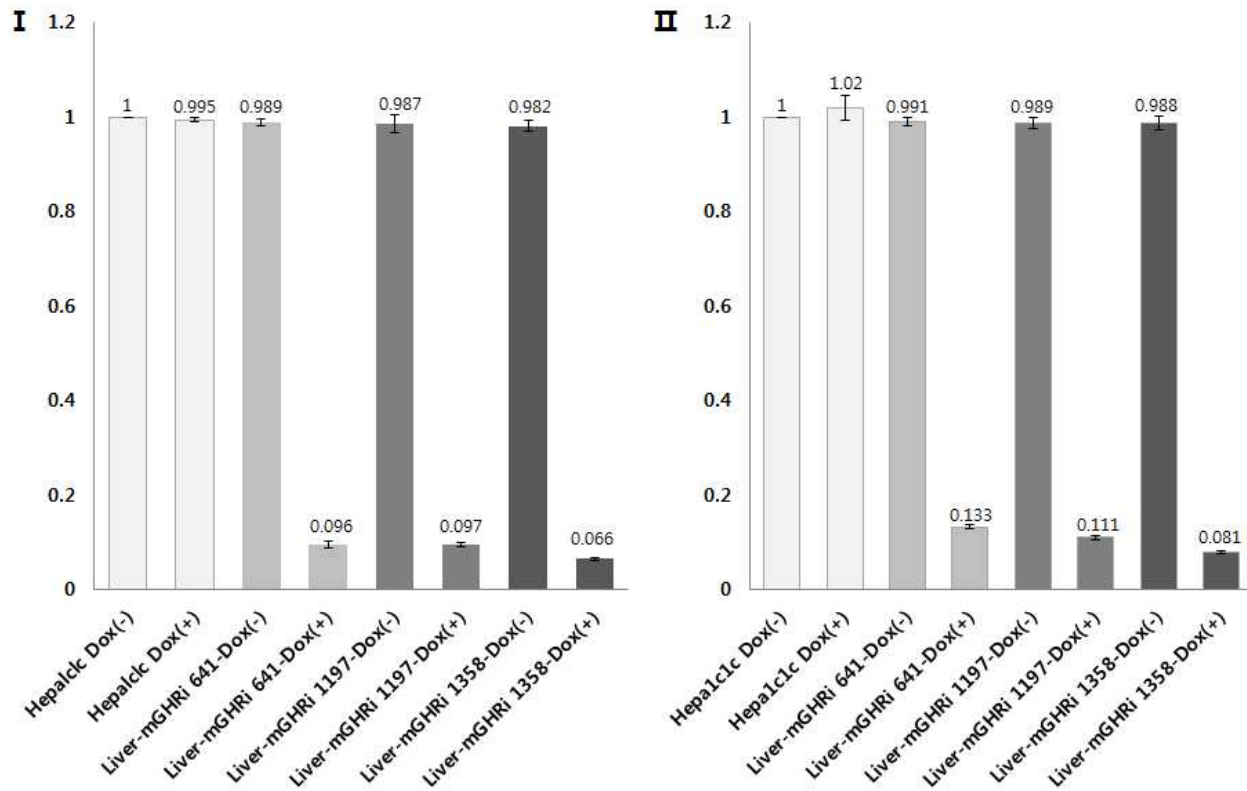


Fig. 14. Efficiency of mGHR (I) and mIGF-1 (II) knock-down using mGHRi shRNA in Hepa1c1c7-TetRNAi-mGHRi-ATINW cells. Dox (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; Dox (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml) for 48 hrs.

결과적으로, mIGF-1 유전자의 발현을 저해하는 shRNA vector 중에서는 TetRNAi-mIGF1i-674-ATINW에서 가장 높은 85.3%의 억제 효율이 나타내었으며(Fig. 13), mGHR 유전자의 발현 억제는 TetRNAi-mGHRi-1358-ATINW에서 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 14). 이로 인해 mIGF-1 유전자 및 mGHR 유전자의 *in vivo* 실험시 억제율이 가장 높은 각각의 shRNA를 선택하여 적용하고자 하였으며, 선별한 shRNA 발현 vector들은 각 유전자 발현을 doxycycline 조절 하에 knock-down시키기에 적절한 vector인 것으로 판단되었다.

(다) mGHR shRNA를 도입한 형질전환 mouse의 제작

Microinjection용 DNA preparation는 pTetRNAi-mGHRi1358-ATINW를 BsrG I 제한효소로 처리하여 확보된 fragment들을 gel-extraction을 통해서 약 1.6kb backbone fragment을 제거하고 약 7.5kb fragment을 절제하여 gel elution을 실시하였다(Fig. 15).

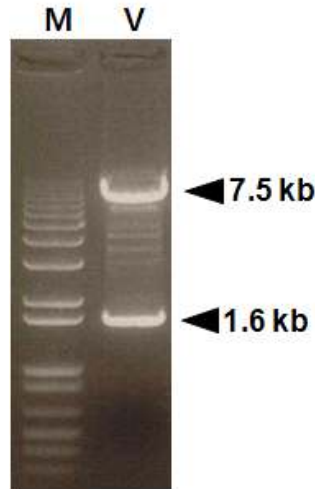


Fig. 15. DNA preparation for microinjection. M, 1kb DNA plus ladder; V, pTetRNAi-mGHRI1358-ATINW digested with BsrG I.

이후 공정한 Microinjection 실험에 Embryo Donor Mouse로 C57BL/6N strain의 mouse를 사용하였으며, 과배란을 위하여 5~8 Weeks female mouse에 PMSG (5IU)와 hCG (5IU)를 48 시간 간격으로 I.P Injection하였다. hCG 주사 후 Stud male과 Mating하였으며, 다음날 vaginal plug check된 mouse를 sacrifice하여 1 세포기 수정란의 embryo collection에 사용하였다. hCG를 처리한 후 18~20시간 경과한 mouse 난관으로부터 수정란(zygote)을 채란하였다. Stereomicroscope를 통해 collected fertilized embryo의 male pronucleus에 micromanipulator를 사용하여, 직접 microinjection용 DNA fragment (~4ng)를 injection하였다. Microinjection용 DNA fragment가 injection된 embryo는 microinjection 실험 당일 0.5 dpc의 ICR pseudopregnant female (Recipient)의 난관에 외과적인 방법으로 transfer하였다. Recipient를 통해 분만한 founder mouse는 생후 14일 이후에 genotyping을 위하여 tail cut 진행하여 mGHR shRNA-1358 founder mouse 91마리에 대하여 phenol-extraction method을 통해 genomic DNA 분리 및 PCR screening을 통해 9마리의 mGHR shRNA-1358 TG mouse (F0)를 확인하였다. PCR screening에 사용한 primer는 5' GAGCTGCTTAATGAGGTCGGA 3'과 5' TCGTCCCGAGTAAAGAGCACACA 3'로 증폭 단편의 크기는 662 bp이다. PCR 조건은 denaturation, annealing, extension 단계로 각각 94°C 에서 5분, 60°C 에서 1분, 72°C 에서 10분씩 33 cycle 반응을 실시하였다. PCR 실험에서 형질전환 개체로 확인된 수컷 5마리는 성숙이 된 8주령 시기에 각각 동일한 주령의 wild type 암컷 두 마리와 교배하였으며, 형질전환 암컷은 두 마리씩 나누어 wild type의 수컷과 교배하였다(Table 4).

Table 4. Production of G1 GHR shRNA transgenic mouse by mating with wild type mouse

G0	Mating	G1	TG G1
G0-01 (♂)	× N-03	8	4 (G1-02, 04, 07, 08)
	× N-04	7	2 (G1-37, 38)
G0-02 (♂)	× N-05		
	× N-06		
G0-03 (♂)	× N-07		
	× N-08		
G0-04 (♂)	× N-09		
	× N-10		
G0-05 (♂)	× N-11		
	× N-12		
G0-06 (♀)	× N-01	6	
G0-07 (♀)	× N-01	4	1 (G1-25)
G0-08 (♀)	× N-02	5	1 (G1-21)
		5	
G0-09 (♀)	× N-02	9	2 (G1-13, 15)
		8	1 (G1-32)

교배 후 각 개체를 분리 사육하여서 각 실험군의 암컷에서 산자를 생산하였다. 생산된 개체가 2주령이 되었을 때 형질전환 개체를 선별하기 위해 각 개체의 꼬리 말단 부분을 0.5 cm 정도 절단하여서 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시하였다. 52마리의 산자에서 PCR을 실시한 결과 11마리의 형질전환 G1 개체가 확인되었으며(Table 6, Fig. 16) 이 개체들은 doxycycline이 첨가된 식이와 급수를 제공하여 mini mouse 생산의 성공 여부를 확인하기 위한 실험에 사용하고자 하였다.

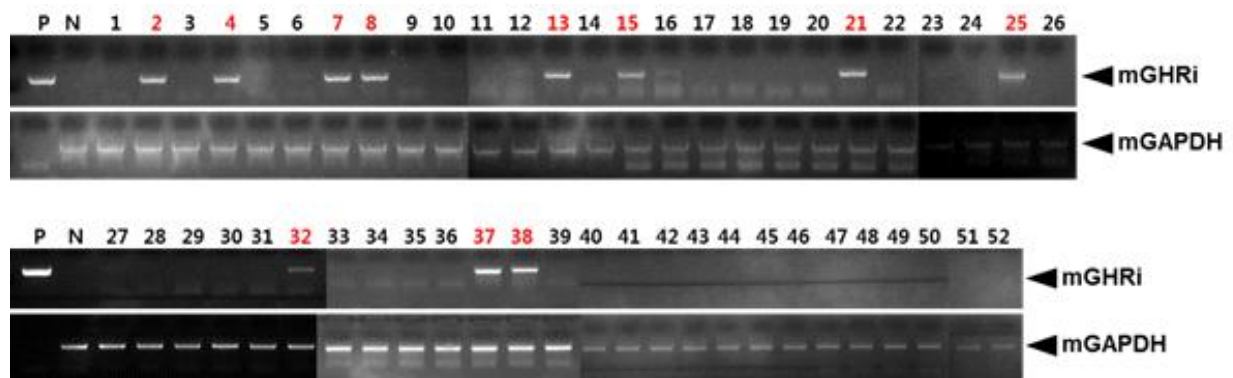


Fig. 16. PCR analyses of GHR shRNA transgenic mice. Genomic DNA was isolated from the blood of two weeks old mice and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-mGHRi1358-ATINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic mouse blood were used, respectively.

형질전환 G1 개체를 대상으로 doxycycline을 2주간 식이 후 개체의 생리적인 변화를 관찰하였으나 소동물인 mouse의 체중이나 체고의 변화가 매우 미미하여 이를 근거로 mini mouse의 생산 성공 여부를 확인하는 데는 어려움이 있는 것으로 판단되었다. 이에 본 연구의 주 실험 대상인 닭에 한정하여 실험을 진행하고자 하였다.

다. 형질전환 소형 닭 생산을 위한 vector system의 구축

(1) Chicken GHR 유전자에 대한 shRNA 발현 vector system의 구축

(가) Chicken GHR 유전자에 대한 shRNA 제작

닭의 RNA 간섭 서열은 mouse의 간섭 서열과 마찬가지로 Clontech사의 온라인 프로그램인 RNAi Target Sequence Selector를 이용하여 design하였다. 닭의 체성장과 관련된 유전자 중 하나인 GHR (GenBank accession No. NM_001001293.1)의 cDNA 서열을 RNAi Target Sequence Selector에 입력한 후 프로그램을 실행하여 3개의 표적 서열을 도출하였다. 각각의 표적 서열은 전체의 cDNA 서열 중 ORF (open reading frame) 부분에 해당하는 서열만을 선택하였으며, 선택된 각 서열은 다시 Clontech사의 shRNA Sequence Designer 프로그램을 통하여 shRNA 발현 vector와 결합할 수 있는 형태로 design하였다. 각 shRNA를 코딩하는 oligo nucleotide는 sense, loop, antisense 그리고 전사 중지 서열인 6 base의 poly T로 구성되어 있으며 각 shRNA의 서열은 다음과 같다(Table 5).

Table 5. Designed shRNAs targeting the mRNA of cGHR gene

Target Gene	siRNA Target Sequence	shRNA Sequence
chicken GHR	cGHR siRNA-241 GGAAAGAATGTC CGGATTA	Top Strand (65bp) 5'-gatccGGAAAGAATGTCCGGATTATTCAAGAGATA ATCCGGACATTCTTTCCTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGGAAAGAATGTCCGGATT ATCTCTTGAATAATCCGGACATTCTTTCc-3'
	cGHR siRNA-536 CAAAGAAGTTAA TGAGACA	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCAAAGAAGTTAATGAGACATTCAAGAGA TGTCATTAACCTTCTTTGTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACAAAGAAGTTAATGAGA CATCTCTTGAATGTCTCATTAACCTTCTTGCg-3'
	cGHR siRNA-1831 GCACAGACCAGC TGAACAA	Top Strand (65bp) 5'-gatccGCACAGACCAGCTGAACAATTCAAGAGATT GTTTCAGCTGGTCTGTGCTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGCACAGACCAGCTGAAC AATCTCTTGAATTGTTTCAGCTGGTCTGTGCg-3'

(나) pSIREN-RetroQ-cIGHRi vector system 구축

① pSIREN-RetroQ-cIGHRi vector의 구축

cGHR 유전자의 발현 억제를 위한 shRNA인 cGHRi를 coding하는 65 nucleotide 길이의 DNA를 *Bam*H I 과 *Ecc*R I 으로 처리된 pSIREN-RetroQ vector 내의 U6 promoter 다음에 도입하여 최종적으로 3종류의 pSIREN-RetroQ-cIGHRi vector를 구축하였다(Fig. 17). Cloning된 각 vector는 RNA polymerase III promoter system (human U6 promoter cassette)으로부터 sense RNA와 anti-sense RNA가 one strand로 합성되어 hairpin structure를 통해 shRNA가 생성되어 cIGF-1과 cGHR의 발현을 억제하는 구조이다.

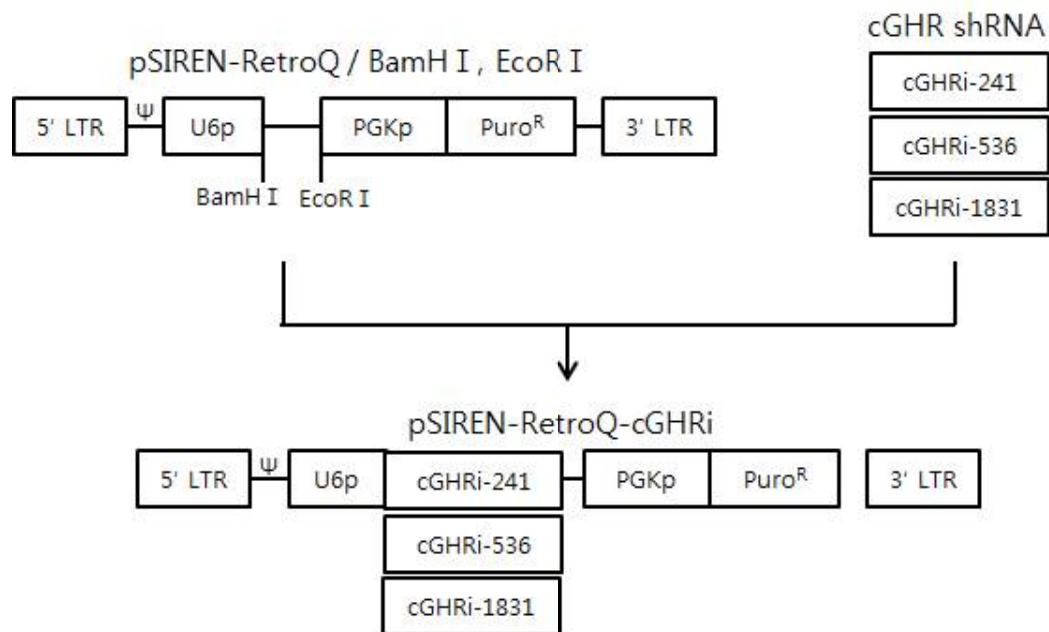


Fig. 17. Construction of pSIREN-RetroQ-cIGHRi retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; U6p, human U6 small nuclear promoter; cGHRi, chicken GHR shRNA; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; Puro^r, puromycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

② cGHR shRNA를 도입한 vector system의 knock-down 효율 검정

닭의 소형화를 위한 본 실험에 앞서서 기초적인 *in vitro* 실험을 진행하였다. 먼저 각각의 cGHR shRNA 유전자가 내재된 retrovirus를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 각각의 vector와 피막 유전자인 *VSV-G* (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)가 포함된 pVSV-G (Clontech, USA)를 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하였다. 48시간이 경과된 후 생산된 virus를 수확하여 닭의 간세포인 LMH/2A (ATCC CRL-2118, USA) 세포에 각각 감염시켰다. 이튿날부터 puromycin (2 µg/ml; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 virus vector가 전이된 세포주를 확립하였다. 본 실험에서 사용한 세포 중 LMH/2A는 10%의 FBS (fetal bovine serum; HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml) (Pen/Strep;

GibcoBRL, USA)이 첨가된 Waymouth's 배지 (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. LMH/2A-SIREN-RetroQ-cGHRi 세포를 72 시간 동안 배양한 후 TRI reagent (TaKaRa, Japan)로 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다. *cGHR* 유전자 발현의 knock-down 여부를 확인하기 위하여 *cGHR* 유전자에 대한 특이적인 PCR primer로 quantitative real-time PCR을 수행하였으며 대조구로 *cGAPDH* 유전자에 대한 primer로 동일한 반응을 실시하였다(Table 6).

Table 6. Chicken shRNA primers used in Real-time PCR Analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)
cGHR	5'-TGAGGCACTTCAAAGTCTTGCC-3' (+)	245
	5'-GTGCTCTTCCCACCTTGGATTT-3' (-)	
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+)	275
	5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	

Bio-Rad 회사(USA)의 CFX96™ real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample을 4개씩 동시에 quantitative real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 2회 반복 실험하였다. CFX manager software로 PCR 결과를 분석하여 각 vector에 따른 *cGHR* 유전자의 발현 정도를 비교한 결과, LMH/2A-SIREN-RetroQ-cGHRi-241, 536, 1831 세포에서 *cGAPDH* 유전자에 대한 *cGHR* 유전자의 억제 효율이 95.2% (100-(100X0.048/1)), 94.4% (100-(100X0.056/1)), 90.8% (100-(100X0.092/1))인 것으로 나타났다(Fig. 18). 이상의 결과로 각 유전자의 target site (*cGHR*-241, 536, 1831)에 대한 shRNA는 *cGHR* 유전자의 발현을 강하게 억제하는 것으로 나타났으며, 이에 본 연구에서 구축한 shRNA vector system은 *cGHR* 유전자 발현을 knock-down 시키기에 적절한 vector임을 확인할 수 있었다.

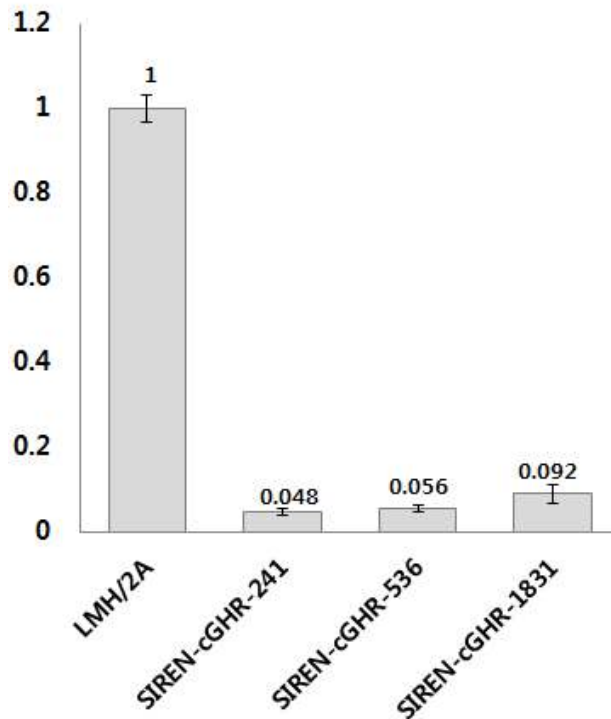


Fig. 18. Efficiency of cGHR knock-down using cGHRi shRNA in LMH/2A cells. SIREN-cGHR, LMH/2A transfected with pSIREN-RetroQ-cGHRi.

(다) pTetRNAi-cGHRi-ATINW vector system 구축

① pTetRNAi-cGHRi-ATINW vector의 구축

개체 내에서 cGHR에 대한 shRNA의 지속적인 발현을 억제하고 필요시에만 발현을 turn on 시켜서 cGHR 유전자의 발현을 저해하여 애완용 소형 닭을 생산할 수 있도록 각 shRNA를 tetracycline inducible expression system (Tet system)에 cloning하고자 하였다. 그 전단계로 backbone 형태의 vector인 albumin promoter의 조절 하에 tTs (tetracycline-controlled transcriptional suppressor) sequence (Zhu 등, 2001)가 도입되어 있고 TREmod/U6p promoter 조절 하에 shRNA 서열을 도입할 수 있는 pTetRNAi-ATINW와, PGK promoter 조절 하에 tTs가 도입되어 있으며 shRNA 도입 부위는 전자와 동일한 pTetRNAi-PTINW vector를 재조합하였다. 자세한 재조합 과정은 Fig. 19과 같다.

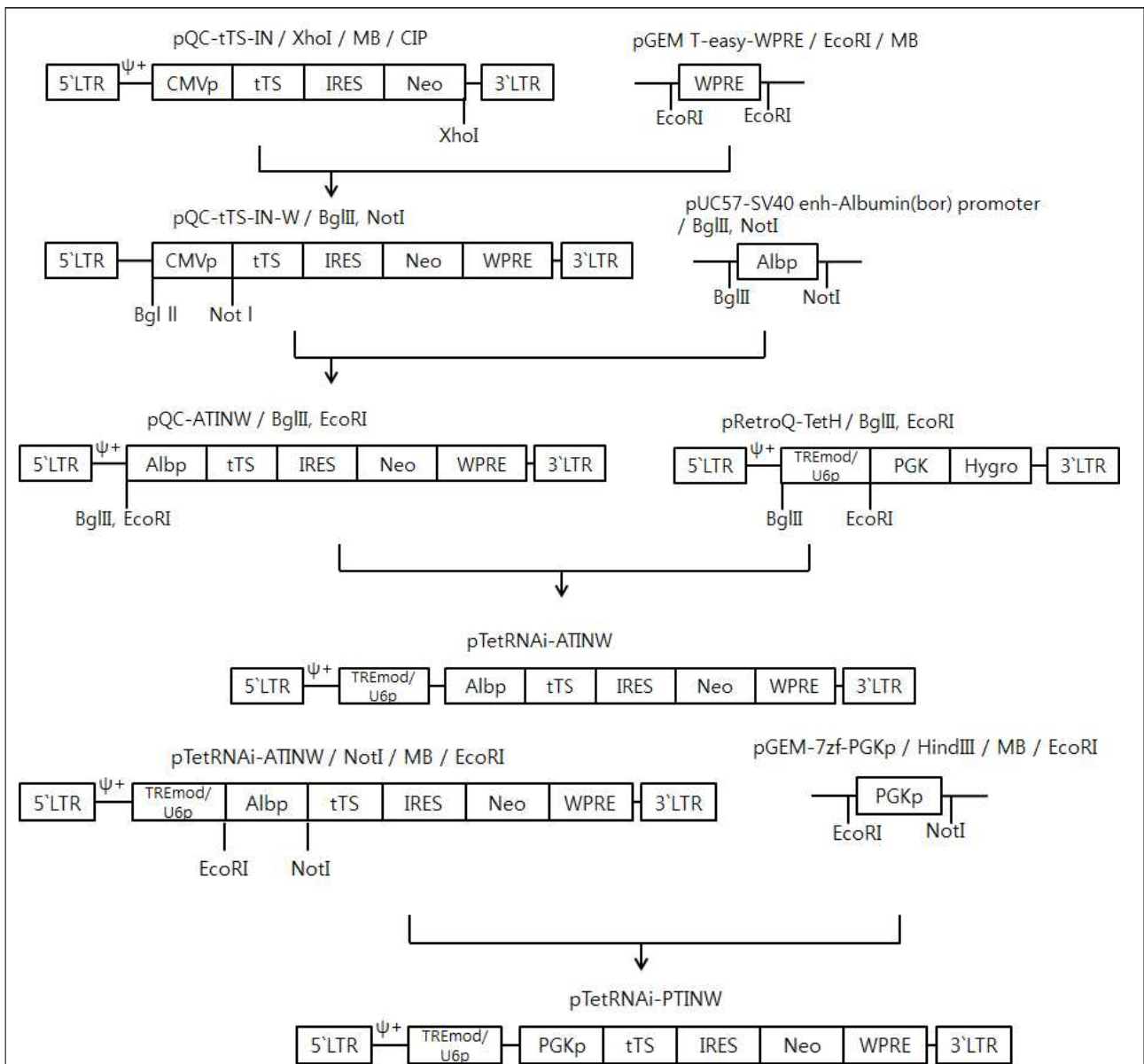


Fig. 19. Strategies of pTetRNAi-ATINW and pTetRNAi-PTINW retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; CMV promoter, cytomegalovirus promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; AlbP, albumin promoter; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; AlbP, albumin promoter; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; Hygro, hygromycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

구축된 pTetRNAi-ATINW vector에 cGHR 유전자 발현을 knock-down시키기 위한 cGHR shRNA 서열을 도입하고자 하였다. 최종적인 vector 구조는 Fig. 20와 같다.

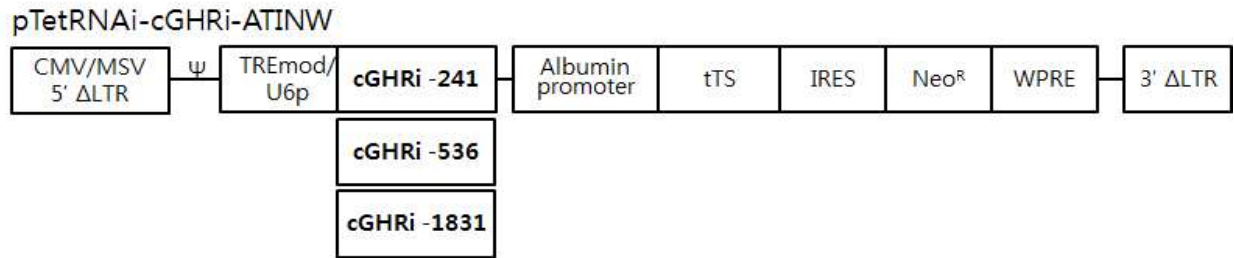


Fig. 20. Construction of pTetRNAi-cGHRi-ATINW retrovirus vectors. CMV/MSV LTR, cytomegalovirus/mouse sarcoma virus hybrid promoter long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cGHRi, chicken GHR shRNA; Albp, albumin promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo^R, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

② cGHR shRNA를 도입한 Tet vector system의 knock-down 효율 검정

구축한 vector가 도입된 각각의 표적세포에서 cGHR shRNA에 의한 cGHR 유전자 발현의 knock-down 효율을 검정하기 위한 *in vitro* 실험을 실시하였다. Retrovirus의 생산 및 표적세포로의 감염, total RNA의 추출과 quantitative real-time PCR 실험 기법은 pSIREN-RetroQ-shRNA vector를 이용한 실험과 동일한 방법을 사용하였다. 본 실험에 사용된 vector의 경우 Tet-system이 적용된 shRNA vector이므로 각 세포에서 cGHR shRNA의 발현이 유도적으로 조절되는 지를 알아보기 위해 발현 유도 물질인 doxycycline을 1 µg/ml의 농도로 72시간동안 처리하였다. 실험에 사용된 doxycycline은 tetracycline의 유도체로서 적은 양으로도 발현 유도 효율이 높은 물질로 알려져 있으며(Cunningham 등, 1997), 실험에 사용한 doxycycline의 최적 농도(1 µg/ml)는 Urlinger 등 (2000)의 보고와 본 연구자의 예비 실험을 통해 결정하였다. LMH/2A-TetRNAi-cGHR1i-241, 536, 1831-ATINW 세포에서 *cGAPDH* 유전자에 대한 *cGHR* 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과 효율이 92.6%, 93.4%, 94.5% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었고, doxycycline에 의한 유도적 shRNA 발현이 이루어져 knock-down 되고 있음을 알 수가 있었다(Fig. 21). 이상의 결과를 종합하여 볼 때, doxycycline을 72시간 처리한 후 cGHR shRNA 중에서는 TetRNAi-cGHR1i-1831-ATINW에서 가장 높은 94.5%의 발현 억제 효율을 나타내었다. 이로 인해 *cGHR* 유전자의 *in vivo* 실험 시 억제율이 가장 높은 각각의 shRNA가 도입된 Tet vector를 선택하여 적용하고자 하였다. 각 유전자의 target site (cGHR-241, cGHR-536, cGHR-1831)에 대한 shRNA vector들은 세포내 total RNA에 대한 *cGHR* 유전자의 억제 정도에서 높은 발현 억제율을 나타낸 것으로 보아서, 결과적으로 각 유전자의 발현을 유도적으로 knock-down 시키기에 적절한 vector임을 확인할 수 있었다.

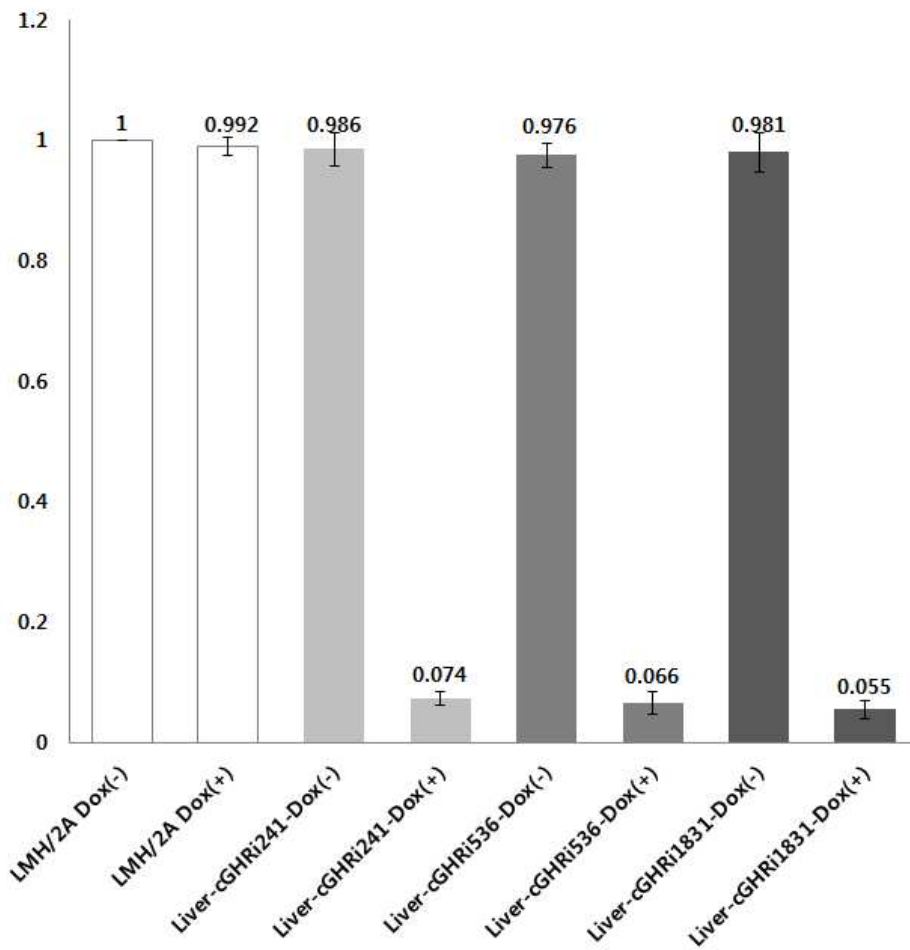


Fig. 21. Efficiency of cGHR knock-down using cGHR shRNA in LMH/2A-TetRNAi-cGHRiATINW cells. Dox (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; Dox (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 hrs.

(2) Chicken GH 발현을 저하시키기 위한 cGH shRNA 제작 및 virus vector의 구축

(가) chicken GH shRNA 제작

닭의 체성장과 관련된 또다른 유전자인 chicken GH (GenBank accession No. M35609.1)의 발현을 억제하기 위한 shRNA를 제작하기 위하여 먼저 cDNA 서열을 RNAi Target Sequence Selector에 입력한 후 프로그램을 실행하여 각각 6개씩의 표적 서열을 도출하였다. 각각의 표적 서열은 전체의 cDNA 서열 중 ORF (open reading frame) 부분에 해당하는 서열만을 선택하였으며, 선택된 각 서열은 다시 Clontech사의 shRNA Sequence Designer 프로그램을 통하여 shRNA 발현 vector와 결합할 수 있는 형태로 design하였다(Table 7). 각 shRNA를 코딩하는 oligo nucleotide는 sense, loop, antisense 그리고 전사 중지 서열인 6 base의 poly T로 구성되어 있다.

Table 7. Designed shRNAs targeting the mRNA of cGH gene

Target Gene	siRNA Target Sequence	shRNA Sequence
chicken GH	cGH siRNA-310 CCAGCAGAAGTC AGACATG	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCCAGCAGAAGTCAGACATGTTCAAGAGA CATGTCTGACTTCTGCTGGTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACCAGCAGAAGTCAGACA TGCTCTTGAACATGTCTGACTTCTGCTGGCg-3'
	cGH siRNA-325 CATGGAGCTGCT TCGGTTT	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCATGGAGCTGCTTCGGTTTTTCAAGAGAA AACCGAAGCAGCTCCATGTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACATGGAGCTGCTTCGGTT TTCTCTTGAAAAACCGAAGCAGCTCCATGCg-3'
	cGH siRNA-667 GAGCAACTGCAC CATCTGA	Top Strand (65bp) 5'-gatccGAGCAACTGCACCATCTGATTCAAGAGATC AGATGGTGCAGTTGCTCTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGAGCAACTGCACCATCTG ATCTCTTGAATCAGATGGTGCAGTTGCTCg-3'
	cGH siRNA-376 CGTGCAATACCT AAGCAAG	Top Strand (66bp) 5'-gatccGCGTGCAATACCTAAGCAAGTTCAAGAGAC TTGCTTAGGTATTGCACGTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACGTGCAATACCTAAGCAA GTCTCTTGAACTTGTAGGTATTGCACGCg-3'
	cGH siRNA-525 GACCCACCTACG ATAAGTT	Top Strand (65bp) 5'-gatccGACCCACCTACGATAAGTTTTCAAGAGAAA CTTATCGTAGGTGGGTCTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGACCCACCTACGATAAGT TTCTCTTGAAAACCTTATCGTAGGTGGGTCg-3'
	cGH siRNA-202 GTTCGAACGCAC CTATATT	Top Strand (65bp) 5'-gatccGTTCGAACGCACCTATATTTTCAAGAGAAA TATAGGTGCGTTCGAACTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGTTCGAACGCACCTATAT TTCTCTTGAAAATATAGGTGCGTTCGAACg-3'

이상의 *cGH* 유전자에 대한 shRNA 서열들은 pTetRNAi-PTINW 및 pTetRNAi-rGHpTINW, 그리고 pLN-TetRNAi-rGHpTW vector에 cloning하여 유전자 발현 저해 효과를 검정하고자 하였다.

(나) pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector system의 구축

① pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector의 구축

닭의 성장을 저해하기 위해서 확보한 *cGH* 유전자에 대한 shRNA를 평상시에는 발현을 억제하다가 필요시에만 turn on시켜서 mini chicken을 생산하도록 하기 위하여 Tet system에 shRNA를 cloning하였다. 1차년도에서 구축한 pTetRNAi-PTINW vector에 *cGH* shRNA를 각각 도입하여 pTetRNAi-cGHi-PTINW를 구축하였으며 전체적인 과정은 다음과 같이 진행하였다(Fig. 22).

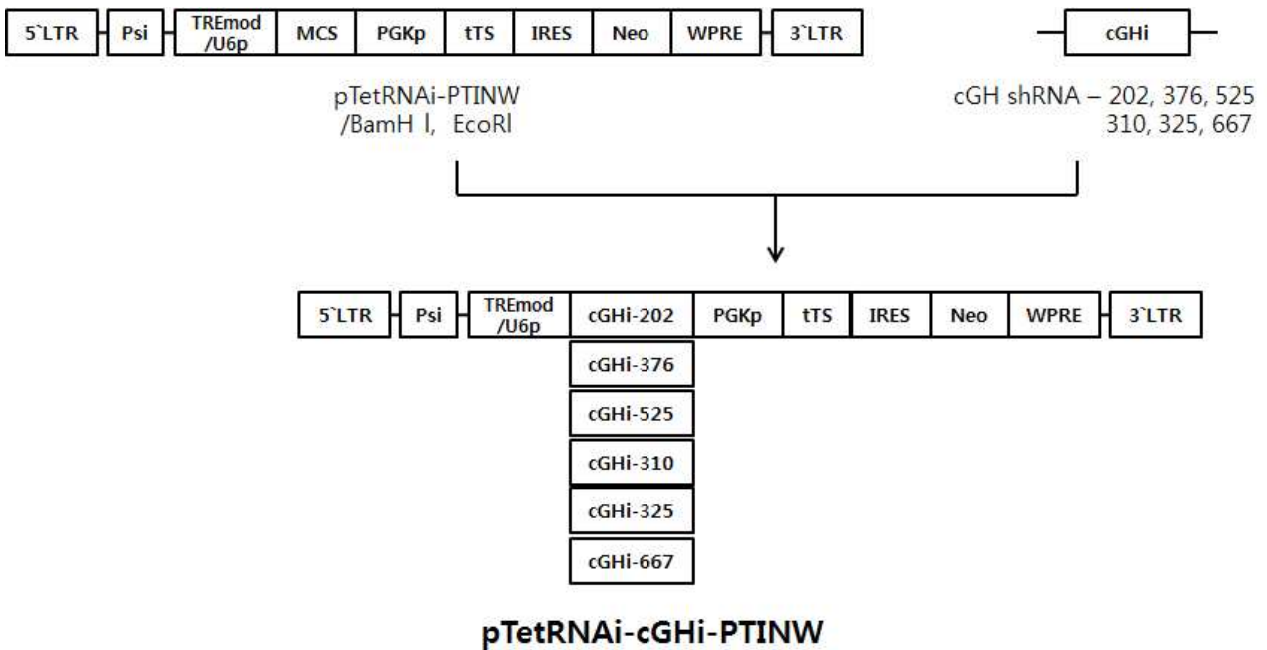


Fig. 22. Strategies of pTetRNAi-cGHi-PTINW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; MCS, multicloning site; PGKp, phosphoglycerate kinase-1 promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; cGHi, chicken GH shRNA. Length of each sequence is not drawn to scale.

또한 *cGH* shRNA의 발현을 보다 조직특이적으로 국한하기 위하여 tTS 서열에 대한 PGK promoter를 rGH promoter로 대체하여서 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector를 구축하였다. 그 과정은 다음과 같다(Fig. 23).

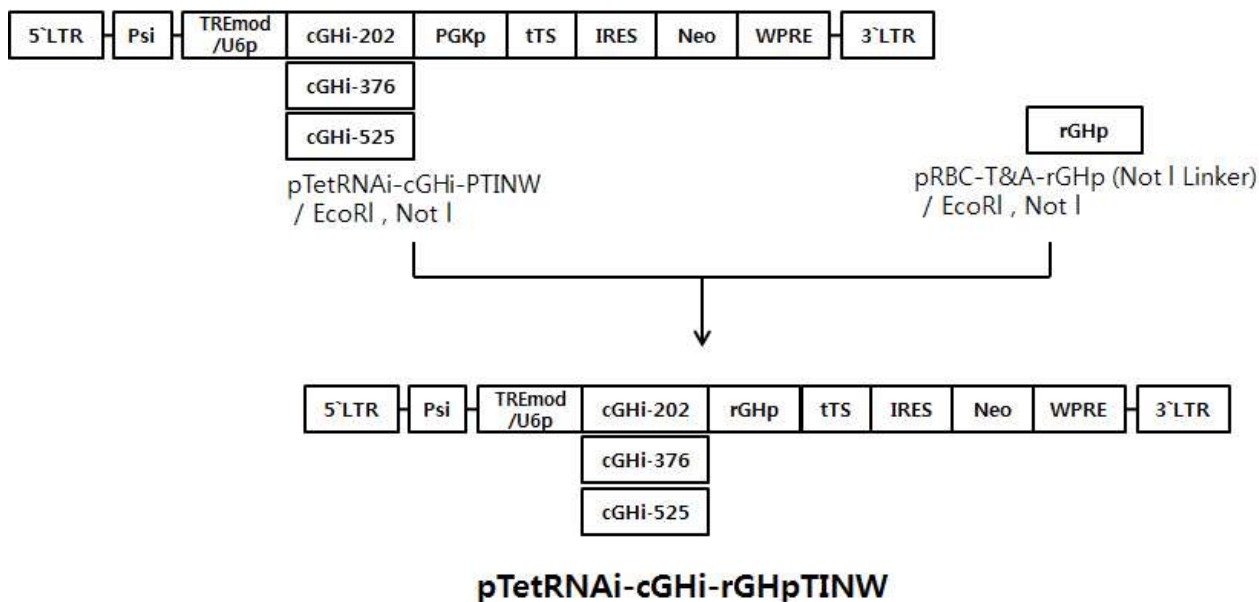


Fig. 23. Strategies of pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cGHi, chicken GH shRNA; PGKp, phosphoglycerate kinase-1 promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; rGHp, rat GH promoter. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW system의 *in vitro*에서의 cGH 유전자 발현의 knock-down 효율 검정

전단계에서 구축한 각 vector의 cGH 유전자 발현에 대한 knock-down 효율을 *in vitro*에서 검정하고자 하였다. 각 cGH shRNA를 전이시키기 위한 표적세포로 CEF-LNC-cGH 세포주를 구축하여 사용하였다. 이 세포는 CEF 세포에 LNC-cGH virus를 감염시켜서 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418이 첨가된 배양액으로 2주간 배양하여 유전자가 전이된 세포만을 선별하여 구축한 세포이다. cGH shRNA를 전이시키기 위한 virus 생산 system은 다음과 같은 과정으로 구축되었다. 제조합한 pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector는 GP2 293 세포에 transfection하여 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 G418이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 GP2 293-pTetRNAi-cGHi-PTINW와 GP2 293-pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW 세포주를 확립하였다. 확립한 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 48시간 후 virus를 수확하여 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C 에 보관하였다. 생산한 각각의 virus는 24시간 전에 1×10^6 개/60 mm dish로 준비한 CEF-LNC-cGH 세포에 감염시켰다. TetRNAi-cGHi-PTINW와 TetRNAi-cGHi-rGHpTINW virus를 감염시킨 각각의 세포주는 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하여 *in vitro* 분석 실험에 사용하였다. Tetracycline 계열의 물질에 의한 cGH shRNA 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 virus에 감염된 각각의 CEF 세포를 doxycycline이

1 µg/ml의 농도로 첨가된 배양액에서 72시간동안 배양하였다. 72시간동안 배양한 세포에서 ELISA 실험에 사용할 배양액과 quantitative real-time PCR에 사용할 RNA를 분리하였다. cGH shRNA에 의한 cGH 유전자의 발현 억제 효과를 quantitative real-time PCR 방법으로 분석하였으며 실험 과정은 cGHR shRNA의 knock-down 효율성 측정 실험과 동일한 과정으로 진행하였다. 단, quantitative real-time PCR 실험에 사용한 cGH 유전자에 특이적인 PCR primer와 대조구로서의 cGPAPDH에 대한 primer 서열은 다음과 같다(Table 8).

Table 8. Chicken shRNA Primers used in Real-time PCR Analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)
cGH	5'-TTTTTGGCACCTCAGACAGAGT-3' (+)	211
	5'-ACCTTGTGCAGATCCTTCTTGA-3' (-)	
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+)	275
	5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	

먼저 TetRNAi-cGHi-PTINW vector virus를 감염시킨 CEF-LNC-cGH 세포에서 각각의 shRNA의 cGH 유전자에 대한 발현 억제 효율을 측정한 결과, shRNA 중 cGHi-525가 0.174/0.651 값으로 cGH 유전자의 발현이 26.7%를 제외한 73.3%의 가장 높은 억제 효율을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 24). 이 외에 cGHi-202의 억제 효율은 62.1% (100-(100X0.268/0.708)), cGHi-376의 억제 효율은 46.2% (100-(100X0.231/0.429)), cGHi-310의 억제 효율은 33.1% (100-(100X0.412/0.616)), cGHi-325의 억제 효율은 54.2% (100-(100X0.332/0.725)), 그리고 cGHi-667의 억제 효율은 24.0% (100-(100X0.408/0.537))로 나타났다(Fig. 24).

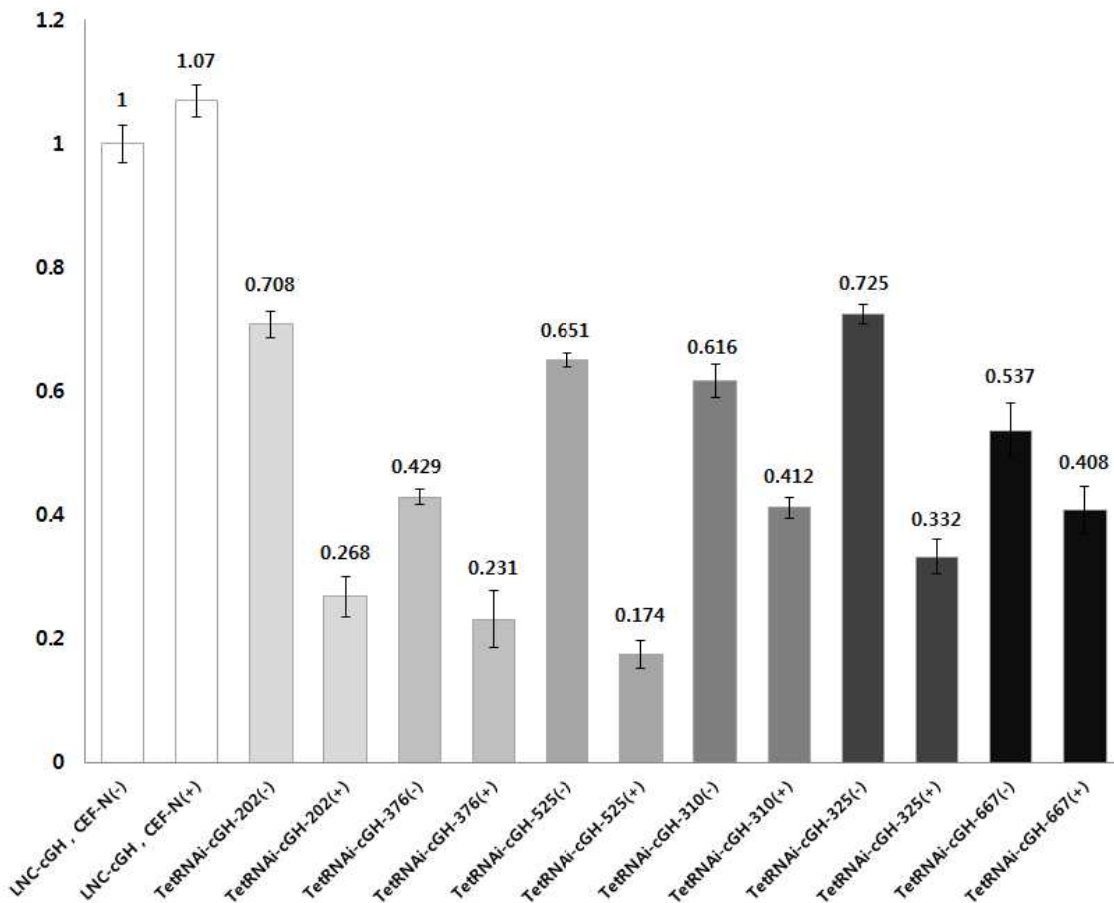


Fig. 24. Real-Time analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells infected with TetRNAi-cGHi-PTINW. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml) for 72 hrs.

Real-time PCR 결과를 바탕으로 하여 cGH의 knock-down 효율이 비교적 높은 cGH shRNA-202, 376, 525에 의한 cGH 발현 억제 양상을 ELISA 방법으로 분석하고자 하였다. 이 실험에서는 조직특이적인 promoter인 rGH promoter가 도입된 TetRNAi-cGHi-rGHpTINW virus vector가 전이된 CEF-LNC-cGH 세포주에서 실시하였다. ELISA 실험은 CUSABIO (China)사의 제품인 chicken GH ELISA kit을 사용하였으며 실험 과정은 다음과 같다. cGH primary antibody가 pre-coating되어 있는 microplate well에 단계적으로 희석해 둔 standard와 배양액을 50 μ l씩 더한 후 각 well에 50 μ l의 conjugate를 더해 주었다. 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후, 각 well의 반응액을 제거하고 wash buffer로 3회 반복하여 수세하였다. 수세한 각 well에 HRP-avidin을 각각 50 μ l씩 더하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 세척을 실시하고, 각각의 well에 substrate를 50 μ l씩 더하여 빛이 차단된 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 종결되도록 stop solution 50 μ l를 각 well에 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 OD 값을 측정하였다. ELISA 분석을 실시한 결과에서는 shRNA가 전

이되지 않은 CEF-LNC-cGH 세포에서는 doxycycline의 첨가 여부와 상관없이 cGH 단백질 양의 변화가 보이지 않은 반면, cGH shRNA-202가 전이된 세포에서는 doxycycline의 첨가에 따라 17.7%의 발현 억제율을 나타내었으며 cGH shRNA-376이 전이된 세포에서는 44.2%, cGH shRNA-525가 전이된 세포에서는 39.0%의 억제 효율이 확인되었다(Fig. 25).

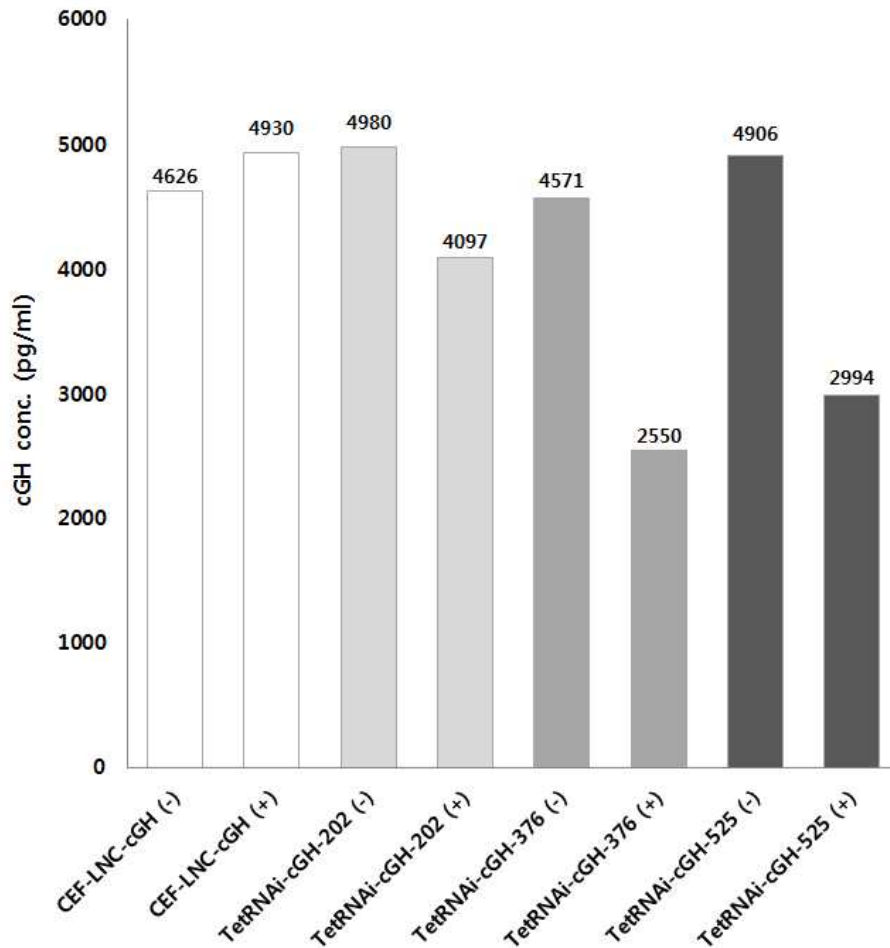


Fig. 25. ELISA analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells infected with TetRNAi-cGH-rGHpTINW. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml) for 72 hrs.

이상의 결과를 근거로 하여 cGH shRNA 중에서 realtime-PCR과 ELISA 결과에서 비교적 유전자 억제 효율이 높은 것으로 나타난 cGH-525 shRNA를 pLN-TetRNAi-PTW와 pLN-TetRNAi-rGHpTW, 그리고 pCDF-TetRNAi-PTW에 cloning하였으며 각 vector의 유전자 억제 효율을 확인하고자 하였다.

(다) pLN-TetRNAi-cGH-PTW와 pLN-TetRNAi-cGH-rGHpTW vector system의 구축

① pLN-TetRNAi-cGH-PTW와 pLN-TetRNAi-cGH-rGHpTW vector의 구축

이상의 SIN vector 형태인 pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW를 일반적인 MLV 유래의 retrovirus vector 형태인 pLN-TetRNAi-cGHi-PTW와 pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW로 재조합하고자 하였으며 각 vector의 재조합 과정은 다음과 같다(Fig. 26). pLN-TetRNAi-cGHi-PTW는 PGK promoter의 조절 하에 tTs sequence가 도입되어 있고 TREmod/U6p promoter 조절 하에 cGH shRNA 서열이 도입된 형태이며, pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW는 tTS 서열이 rGH promoter 조절 하에 위치해 있다. 또한 효율적인 virus packaging을 위하여 IRES와 neomycin 저항성 유전자 부분을 제거하여 전체적인 vector size를 축소시켰다.

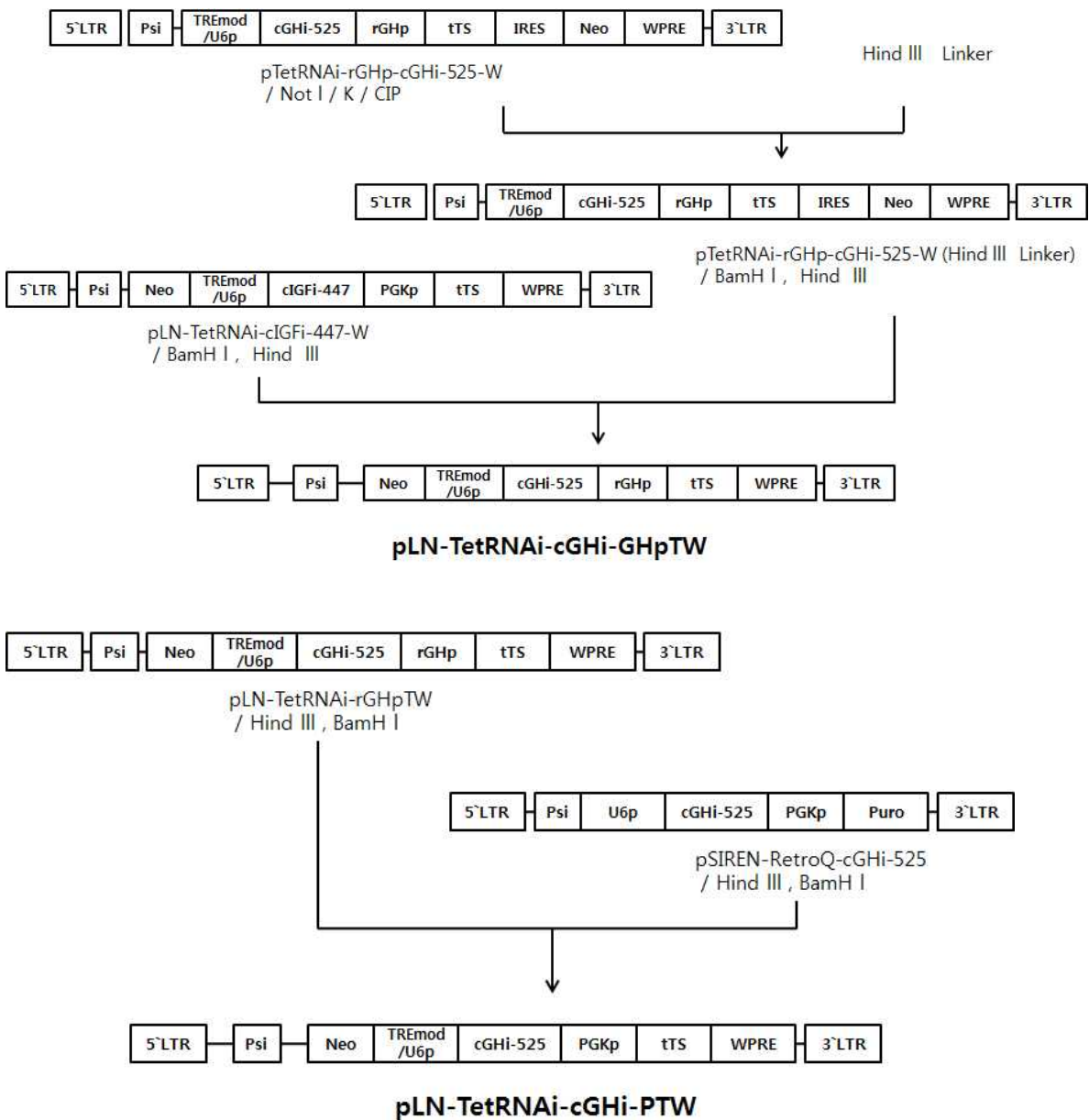


Fig. 26. Strategies of pLN-TetRNAi-cGHi-PTW and pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cGHi, chicken GH shRNA; rGHp, rat GH promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional

suppressor; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; PGKpromoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; Puro, puromycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pLN-TetRNAi-cGHi-PTW와 pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW vector system의 *in vitro*에서의 cGH 유전자 발현의 knock-down 효율 검정
 구축한 각 vector를 GP2 293 세포에 transfection한 후 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 virus 생산 세포주인 GP2 293-pLN-TetRNAi-cGHi-PTW와 GP2 293-pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW를 확립하였다. 이 세포에 pVSV-G를 transfection하여 virus를 생산한 후, 이 virus를 CEF-LNC-hGH 세포에 감염시켜서 cGH shRNA에 의한 cGH 유전자의 knock-down 효율을 검정하고자 하였다. 이에 pLN-TetRNAi-cGHi-PTW와 pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW vector가 도입된 CEF-LNC-hGH 세포주에서 doxycycline 공급 여부에 따른 cGHi-525 shRNA 발현에 의한 cGH 유전자의 knock-down 효율을 real-time PCR로 확인한 결과, LN-TetRNAi-cGHi-PTW가 전이되었을 때는 64.7% ($100 - (100 \times 0.329 / 0.931)$)의 억제 효율을 보였으며 LN-TetRNAi-rGHpPTW가 전이된 경우에는 67.6% ($100 - (100 \times 0.291 / 0.899)$)의 억제 효율을 나타내었다(Fig. 27). 따라서 두 vector system 모두 cGH 유전자의 발현을 유도적으로 knock-down할 수 있는 적절한 vector로 판명되었다.

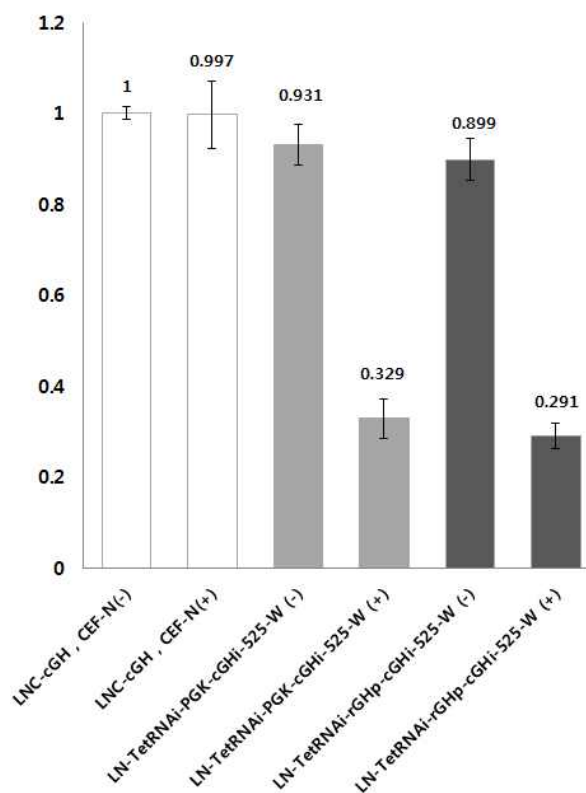


Fig. 27. Quantitative real-time analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells. LN-TetRNAi-PGK-cGHi-525W, CEF-LNC-cGH cell infected with LN-TetRNAi-cGHi-PTW virus; LN-TetRNAi-rGHp-cGHi-525W, CEF-LNC-cGH cell infected with

LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus; (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml) for 72 hrs.

이 세포주를 이용하여 ELISA 실험도 실시하였는데, real-time PCR 실험 결과와 마찬가지로 cGH 유전자 발현의 knock-down 효과를 확인할 수 있었다. LN-TetRNAi-cGHi-PTW가 60.0% ((100-(100X1851/4627)), LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW가 35.4% ((100-(100X2874/4448))의 knock-down 효율을 나타내었다(Fig. 28).

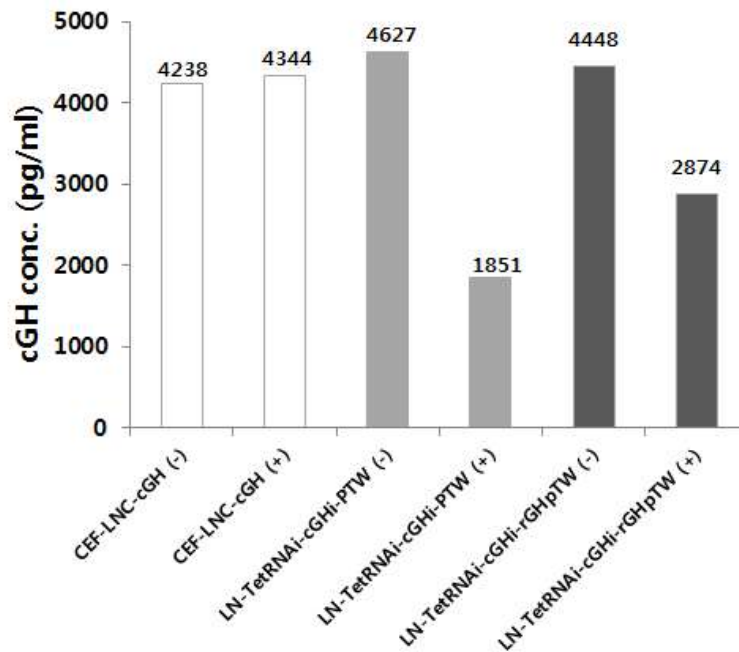


Fig. 28. ELISA analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells infected with LN-TetRNAi-cGHi-PTW or LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml) for 72 hrs.

(라) pTetRNAi-cGHi-PTW vector system의 구축

① pTetRNAi-cGHi-PTW vector의 구축

전단계에서 구축한 LN-TetRNAi-cGHi-PTW vector의 구성 요소 중 tTS 서열 대신에 rtTA2^SM2 서열을 도입하여 pTetRNAi-cGHi-PTW vector를 구축하고자 하였다. 먼저 본 연구실에 있는 pTet2-GPTW를 Not I 과 Klenow fragment, Bgl II 순으로 처리하여 TREtight 서열과 EGFP 유전자를 제거한 후, pTetRNAi-cGHi-PTINW vector를 EcoR I 과 Klenow fragment, Bgl II 순으로 처리하여 분리한 TREmod/U6 promoter-cGHi-525 단편을 도입하여 pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 구축하였으며 자세한 재조합 과정은 Fig. 29에 도식화하여 나타내었다. 결과적으로 구축한 vector인 pTetRNAi-cGHi-PTW는 PGK promoter의 조절 하에 rtTA2^SM2 서열(Zhou 등, 2006)이 도입되어 있고 TREmod/U6p promoter 조절 하에 cGH shRNA 서열이 도입된 형태이다.

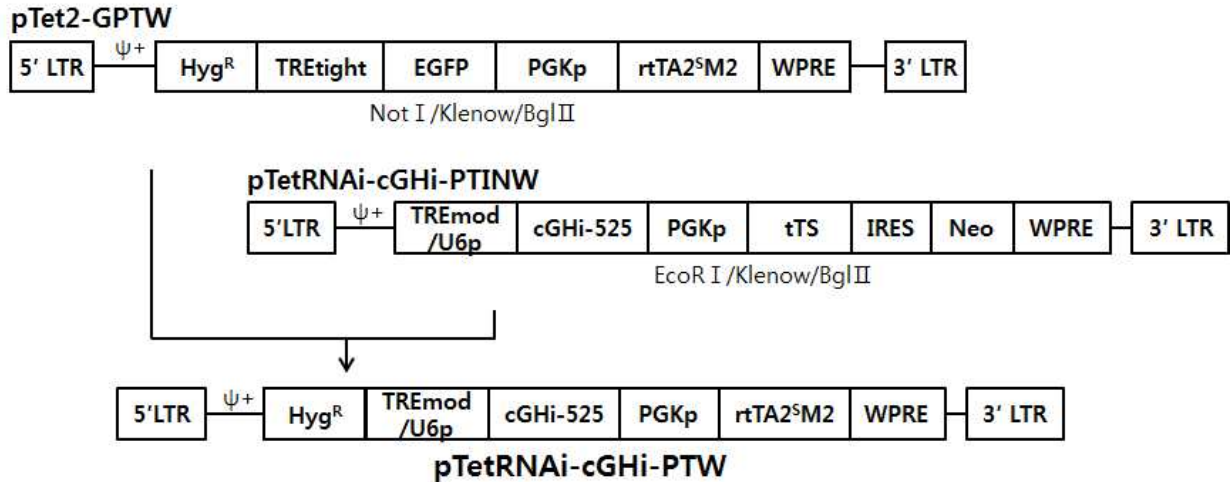


Fig. 29. Strategies of pTetRNAi-cGHi-PTW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Hyg^R, hygromycin resistant gene; TREtight, is a modified Tet response element, which consists of seven direct repeats of a 36-bp sequence and 19-bp tet operator sequence; EGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene; PGKp, phosphoglycerate kinase-1 promoter; rtTA2^SM2, modified rtTA consisting of the reverse tetracycline repressor (rTet-R) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cGHi-525, chicken GH shRNA; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo, neomycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pTetRNAi-cGHi-PTW vector system의 *in vitro*에서의 cGH 유전자 발현의 knock-down 효율 검정

Tetracycline 계열의 물질에 의한 cGH shRNA의 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 다음과 같은 과정으로 실험을 진행하였다. 먼저 전단계에서 구축한 pTetRNAi-cGHi-PTW vector를 GP2 293 세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 150 µg/ml의 농도로 hygromycin (150 µg/ml; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 GP2 293-pTetRNAi-cGHi-PTW 세포주를 확립하였다. 확립한 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 48시간이 경과된 후 생성된 virus를 전날에 60 mm dish 상에 1×10⁶개만큼 준비한 CEF-LNC-cGH 세포에 감염시켰다. 다음날부터 hygromycin이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. Virus를 감염시키지 않은 CEF-LNC-cGH 세포와 TetRNAi-cGHi-PTW virus에 감염된 CEF-LNC-cGH 세포를 1 µg/ml 농도의 doxycycline이 첨가된 배양액에서 48시간과 72시간동안 배양한 후 RNA를 분리하여 quantitative real-time PCR을 실시하였다. cGH 유전자의 knock-down 여부 확인을 위한 quantitative real-time PCR 실험에 사용한 primer는 pTetRNAi-cGHi-PTINW와 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW system 실험에서 사용한 것과 동일한 서열이다(Table 8).

Quantitative real-time PCR 방법으로 분석 과정은 cGHR shRNA의 knock-down 효율성 측정 실험과 동일한 과정으로 진행하였다. 실험 결과, CEF-LNC-cGH 세포에서의 cGH 발현은 doxycycline이 첨가된 배양액에서의 배양 시간과는 무관하게 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났으며, TetRNAi-cGHi-PTW virus에 감염된 CEF-LNC-cGH 세포에서는 cGH 발현이 48시간 배양 후 34.6%, 72시간 배양 후 21.1%의 발현을 나타내어 각각 65.4%, 78.9%의 억제 효율을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 30). 따라서 본 vector를 이용한 cGH 유전자의 발현 억제가 효율적으로 이루어 지는 것을 확인할 수 있었다.

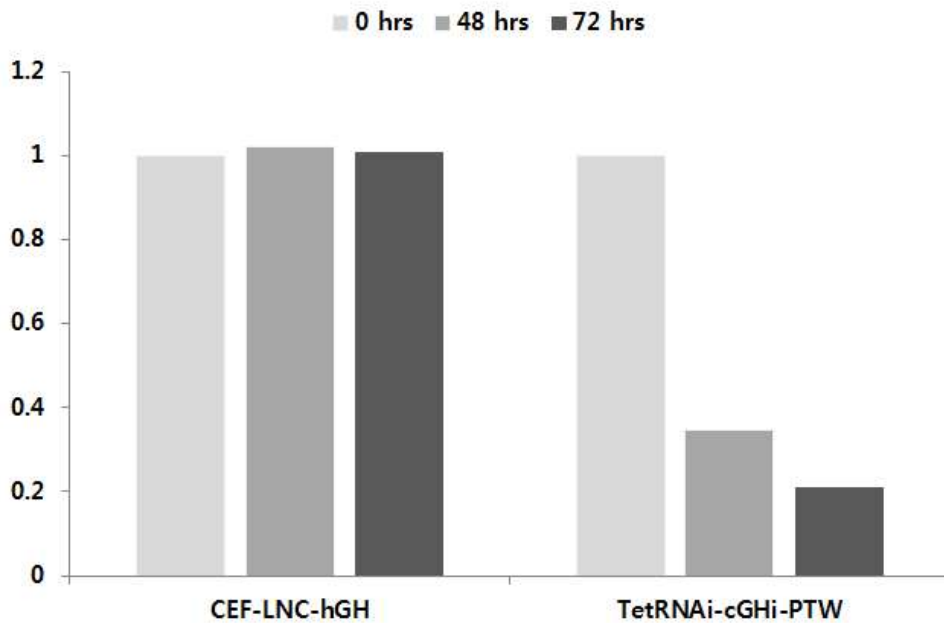


Fig. 30. Real-Time analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells. (-)-48 and (-)-72, cells were grown in the doxycycline-free media for 48 hrs and 72 hrs; (+)-48 and (+)-72, cells were grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hrs and 72 hrs.

(마) pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW vector system의 구축

① pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW vector의 구축

본 연구에서는 cGH shRNA를 FIV vector에도 도입하고자 하였다. Vector의 구축 과정은 Fig. 31과 같으며 구축한 pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW vector도 pLN-TetRNAi-cGHi-PTW vector와 마찬가지로 cGH shRNA의 발현을 doxycycline의 공급 여부에 따라서 유도적으로 조절할 수 있는 구조이다.

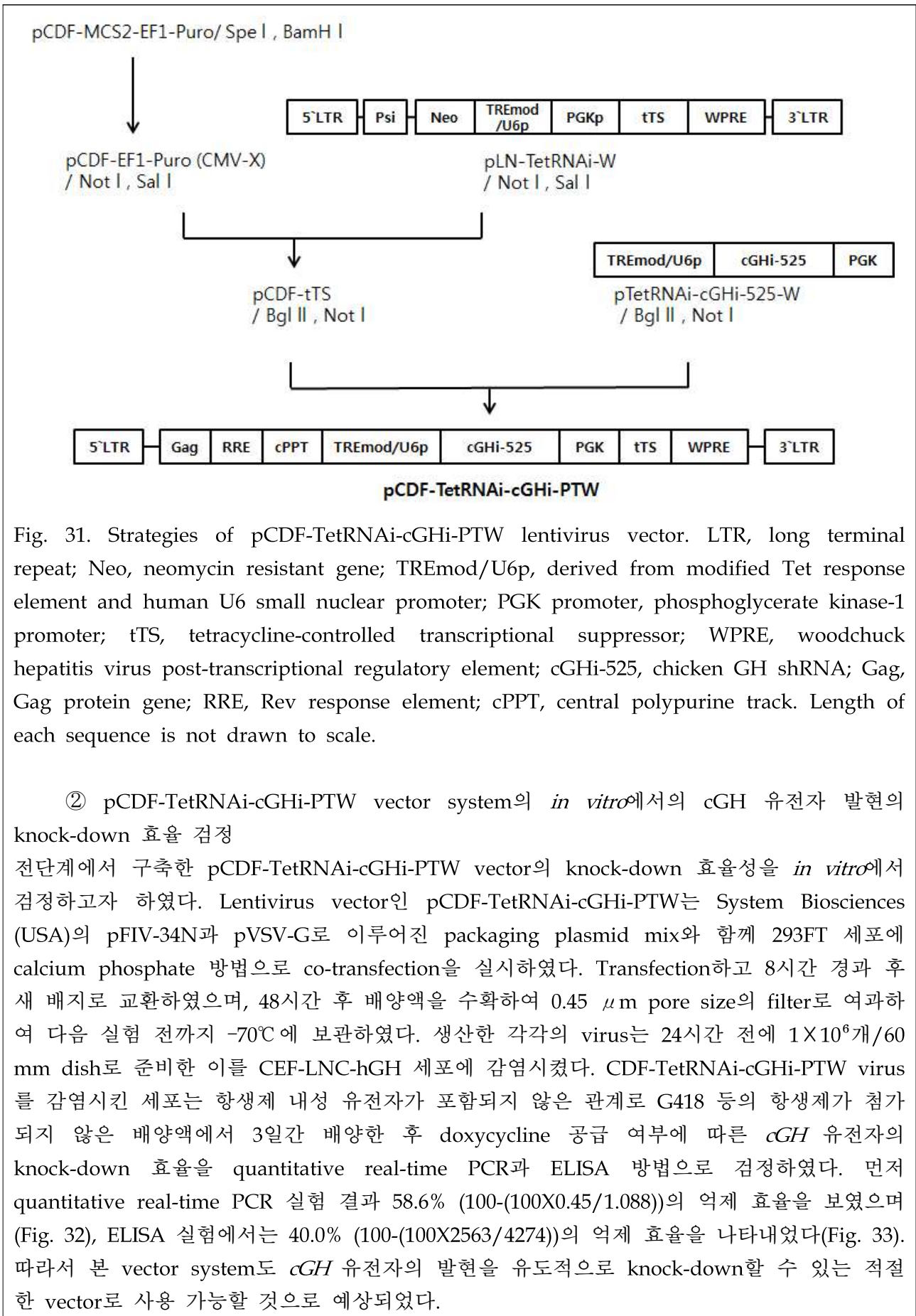


Fig. 31. Strategies of pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW lentivirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; cGHi-525, chicken GH shRNA; Gag, Gag protein gene; RRE, Rev response element; cPPT, central polypurine track. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW vector system의 *in vitro*에서의 cGH 유전자 발현의 knock-down 효율 검정

전단계에서 구축한 pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW vector의 knock-down 효율성을 *in vitro*에서 검정하고자 하였다. Lentivirus vector인 pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW는 System Biosciences (USA)의 pFIV-34N과 pVSV-G로 이루어진 packaging plasmid mix와 함께 293FT 세포에 calcium phosphate 방법으로 co-transfection을 실시하였다. Transfection하고 8시간 경과 후 새 배지로 교환하였으며, 48시간 후 배양액을 수확하여 0.45 μ m pore size의 filter로 여과하여 다음 실험 전까지 -70°C에 보관하였다. 생산한 각각의 virus는 24시간 전에 1×10⁶개/60 mm dish로 준비한 이를 CEF-LNC-hGH 세포에 감염시켰다. CDF-TetRNAi-cGHi-PTW virus를 감염시킨 세포는 항생제 내성 유전자가 포함되지 않은 관계로 G418 등의 항생제가 첨가되지 않은 배양액에서 3일간 배양한 후 doxycycline 공급 여부에 따른 cGH 유전자의 knock-down 효율을 quantitative real-time PCR과 ELISA 방법으로 검정하였다. 먼저 quantitative real-time PCR 실험 결과 58.6% (100-(100×0.45/1.088))의 억제 효율을 보였으며 (Fig. 32), ELISA 실험에서는 40.0% (100-(100×2563/4274))의 억제 효율을 나타내었다(Fig. 33). 따라서 본 vector system도 cGH 유전자의 발현을 유도적으로 knock-down할 수 있는 적절한 vector로 사용 가능할 것으로 예상되었다.

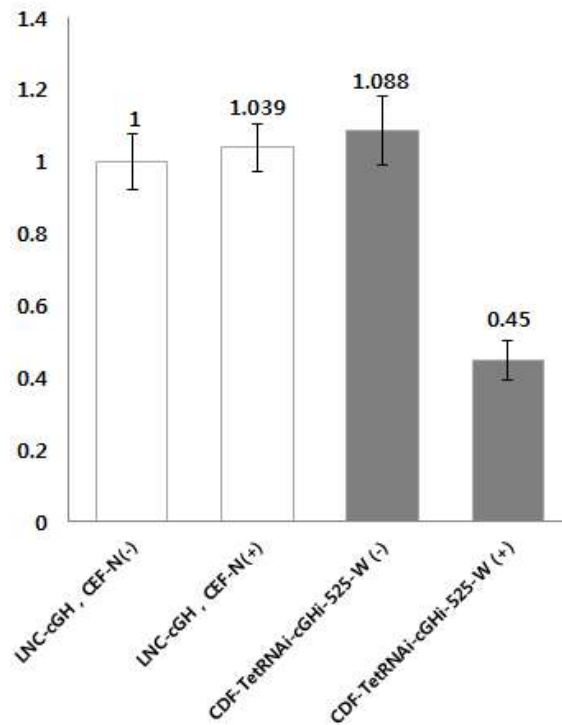


Fig. 32. Quantitative real-time analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells. LNC-cGH, CEF-LNC-cGH cell; CDF-TetRNAi-cGHi-525-W, CEF-LNC-cGH cell infected with CDF-TetRNAi-cGHi-PTW virus; (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 hrs.

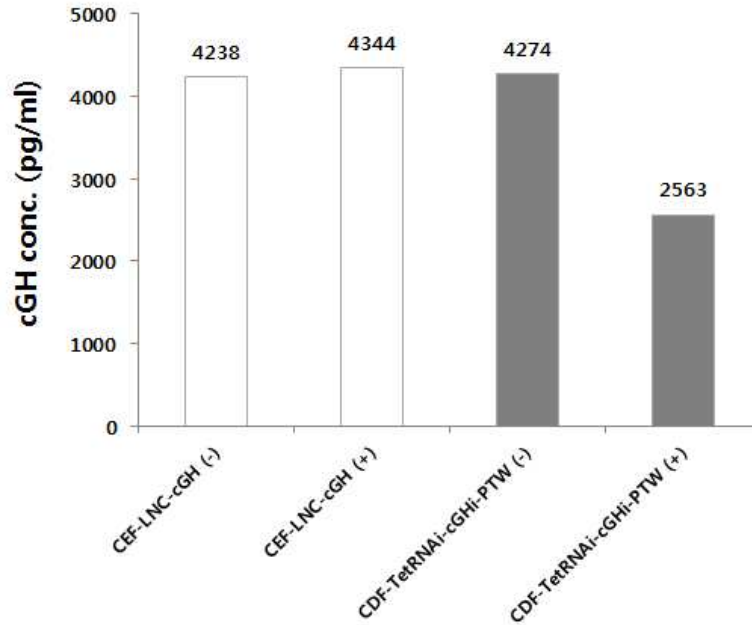


Fig. 33. ELISA analysis of cGH knock-down efficiency using cGH shRNA in CEF-LNC-cGH cells. LNC-cGH, CEF-LNC-cGH cell; CDF-TetRNAi-cGHi-PTW, CEF-LNC-cGH cell infected with CDF-TetRNAi-cGHi-PTW virus; (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 hrs.

(3) Chicken IGF-1 유전자에 대한 shRNA 발현 vector system의 구축

(가) Chicken IGF-1과 chicken GHR 유전자에 대한 shRNA 제작

닭의 IGF-1 RNA 간섭 서열은 Clontech사의 온라인 프로그램인 RNAi Target Sequence Selector를 이용하여 design하였다. 닭의 체성장과 관련된 유전자 IGF-I (GenBank accession No. NM_001004384.2)의 cDNA 서열을 RNAi Target Sequence Selector에 입력한 후 프로그램을 실행하여 3개의 표적 서열을 도출하였다. 각각의 표적 서열은 전체의 cDNA 서열 중 ORF (open reading frame) 부분에 해당하는 서열만을 선택하였으며, 선택된 각 서열은 다시 Clontech사의 shRNA Sequence Designer 프로그램을 통하여 shRNA 발현 vector와 결합할 수 있는 형태로 design하였다(Table 9). 각 shRNA를 코딩하는 oligo nucleotide는 sense, loop, antisense 그리고 전사 중지 서열인 6 base의 poly T로 구성되어 있다.

Table 9. Designed shRNAs targeting the mRNA of cIGF-1 gene

Target Gene	siRNA Target Sequence	shRNA Sequence
chicken IGF-I	cIGF-1 siRNA-307 AGGTGAAGATGC ACACTGT	Top Strand (65bp) 5'-gatccAGGTGAAGATGCACACTGTTTCAAGAGAAC AGTGTGCATCTTCACCTTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGGTGAAGATGCACACTG TTCTCTTGAAACAGTGTGCATCTTCACCTg-3'
	cIGF-1 siRNA-419 GGTTGATGCTCTT CAGTTC	Top Strand (65bp) 5'-gatccGGTTGATGCTCTTCAGTTCTTCAAGAGAGAA CTGAAGAGCATCAACCTTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGGTTGATGCTCTTCAGTTC TCTCTTGAAGAACTGAAGAGCATCAACCg-3'
	cIGF-1 siRNA-447 GACAGAGGCTTCT ACTTCA	Top Strand (65bp) 5'-gatccGACAGAGGCTTCTACTTCATTCAAGAGATGA AGTAGAAGCCTCTGTCTTTTTTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (65bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAAGACAGAGGCTTCTACTTCA TCTCTTGAATGAAGTAGAAGCCTCTGTGc-3'

(나) pSIREN-RetroQ—cIGF1i vector system 구축

① pSIREN-RetroQ—cIGF1i과 pSIREN-RetroQ-cIGHRi vector의 구축

*cIGF-1*과 *cGHR* 유전자의 발현 억제를 위한 shRNA인 cIGF-1i를 *Bam*HI 과 *Eco*R I 으로 처리한 후 pSIREN-RetroQ vector와 재조합하여 3종류의 pSIREN-RetroQ-cIGF-1i vector를 구축하였다(Fig. 34). Cloning된 각 vector는 RNA polymerase III promoter system (human U6 promoter cassette)으로부터 sense RNA와 anti-sense RNA가 one strand로 합성되어 hairpin structure를 통해 shRNA가 생성되어 cIGF-1 유전자의 발현을 억제하는 기작을 가진다.

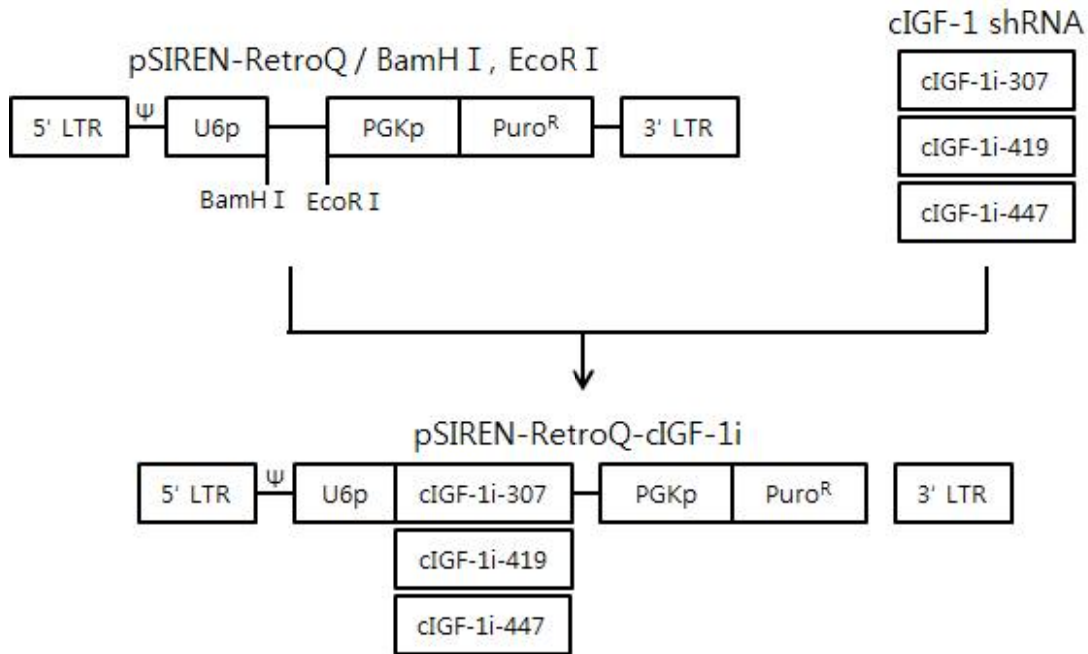


Fig. 34. Construction of pSIREN-RetroQ-cIGF-1i retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; U6p, human U6 small nuclear promoter; cIGF1i, chicken IGF-1 shRNA; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; Puro^r, puromycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

② cIGF-1 shRNA를 도입한 vector system의 knock-down 효율 검증

닭의 소형화를 위한 본 실험에 앞서서 기초적인 *in vitro* 실험을 진행하였다. 먼저 각각의 cIGF-1 shRNA 유전자가 내재된 retrovirus를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 각각의 vector와 피막 유전자인 VSV-G가 포함된 pVSV-G (Clontech, USA)를 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하였다. 48시간이 경과된 후 생산된 virus를 수확하여 CEF 세포에 감염시켰다. 이튿날부터 puromycin (2 µg/ml; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 virus vector가 전이된 세포주를 확립하였다. CEF-SIREN-RetroQ-cIGF-1i 세포를 72시간 동안 배양한 후 TRI reagent (TaKaRa, Japan)로 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다. cIGF-1 유전자 발현의 knock-down 여부를 확인하기 위하여 cIGF-1 유전자에 대한 특이적인 PCR primer로 quantitative real-time PCR을 수행하였으며 대조구로 cGAPDH 유전자에 대한 primer로 동일한 반응을 실시하였다(Table 10).

Table 10. Chicken shRNA Primers used in Real-time PCR Analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)
cIGF-1	5'-ACCTTAACCAGTTCTGCTGCTG-3' (+) 5'-CCTCAGGTCACAACCTCTGGAAG-3' (-)	189
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275

Bio-Rad 회사(USA)의 CFX96™ real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample 을 4개씩 동시에 real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 2회 반복 실험하였다. PCR 반응은 IQ™ SYBR Green qPCR Master mix (Bio-Rad, USA) 10 μl에 각각 5 pmol의 +와 - strand primer, 그리고 cDNA template 30 ng을 넣어 전체 20 μl로 수행하였다. 세포의 total RNA에서 cIGF-1 유전자의 발현량을 측정하기 위하여 internal control인 cGAPDH와 함께 quantitative real-time PCR을 수행하였다. Quantitative real-time PCR 결과를 CFX manager software로 분석하여 Ct값을 결정하였으며, Ct값에서 GAPDH 유전자의 Ct값은 reference로 정하고 cIGF-1 유전자의 Ct값을 target으로 정한 뒤 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법(Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 최종적으로 cIGF-1 유전자의 발현 정도를 비교하였다. CEF-SIREN-RetroQ-cIGF1i-307, 419, 447 세포에서 cGAPDH 유전자에 대한 cIGF-1 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과 발현 효율이 82.6%, 82.5%, 86.8% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 35). 이상의 결과에서 각 유전자의 target site (cIGF1-307, 419, 447)에 대한 shRNA는 cIGF-1 유전자의 발현을 강하게 억제하는 것으로 나타났으며, 이에 따라서 본 연구에서 구축한 shRNA vector system은 cIGF-1 유전자 발현을 knock-down 시키기에 적절한 vector임을 확인할 수 있었다.

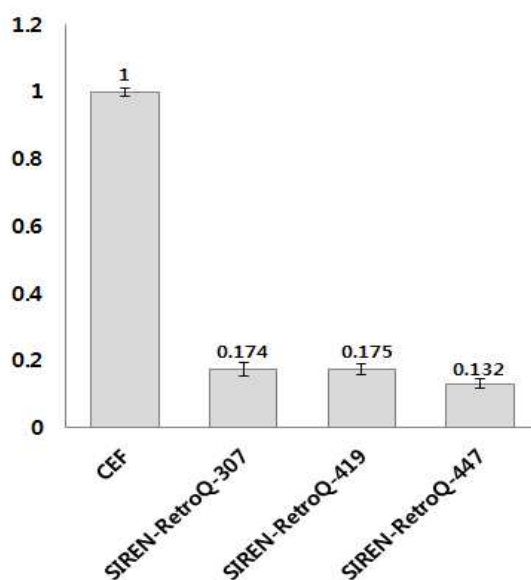


Fig. 35. Efficiency of cIGF-1 knock-down using cIGF-1i shRNA in CEF cells. SIREN-RetroQ, CEF transfected with pSIREN-RetroQ-cIGF1i.

(다) pTetRNAi-cIGF1i-PTINW vector system 구축

① pTetRNAi-cIGF1i-PTINW와 pTetRNAi-cGHRi-ATINW vector의 구축

개체 내에서 cIGF-1에 대한 shRNA의 지속적인 발현을 억제하고 필요시에만 발현을 turn on 시켜서 cIGF-1 유전자의 발현을 저해하여 애완용 소형 닭을 생산할 수 있도록 각 shRNA를 Tet system에 cloning하고자 하였다. 그 전단계로 backbone 형태의 vector인 albumin promoter의 조절 하에 tTs sequence가 도입되어 있고 TREmod/U6p promoter 조절 하에 shRNA 서열을 도입할 수 있는 pTetRNAi-ATINW와, PGK promoter 조절 하에 tTs가 도입되어 있으며 shRNA 도입 부위는 전자와 동일한 pTetRNAi-PTINW vector를 재조합하였다. 자세한 재조합 과정은 Fig. 36과 같다.

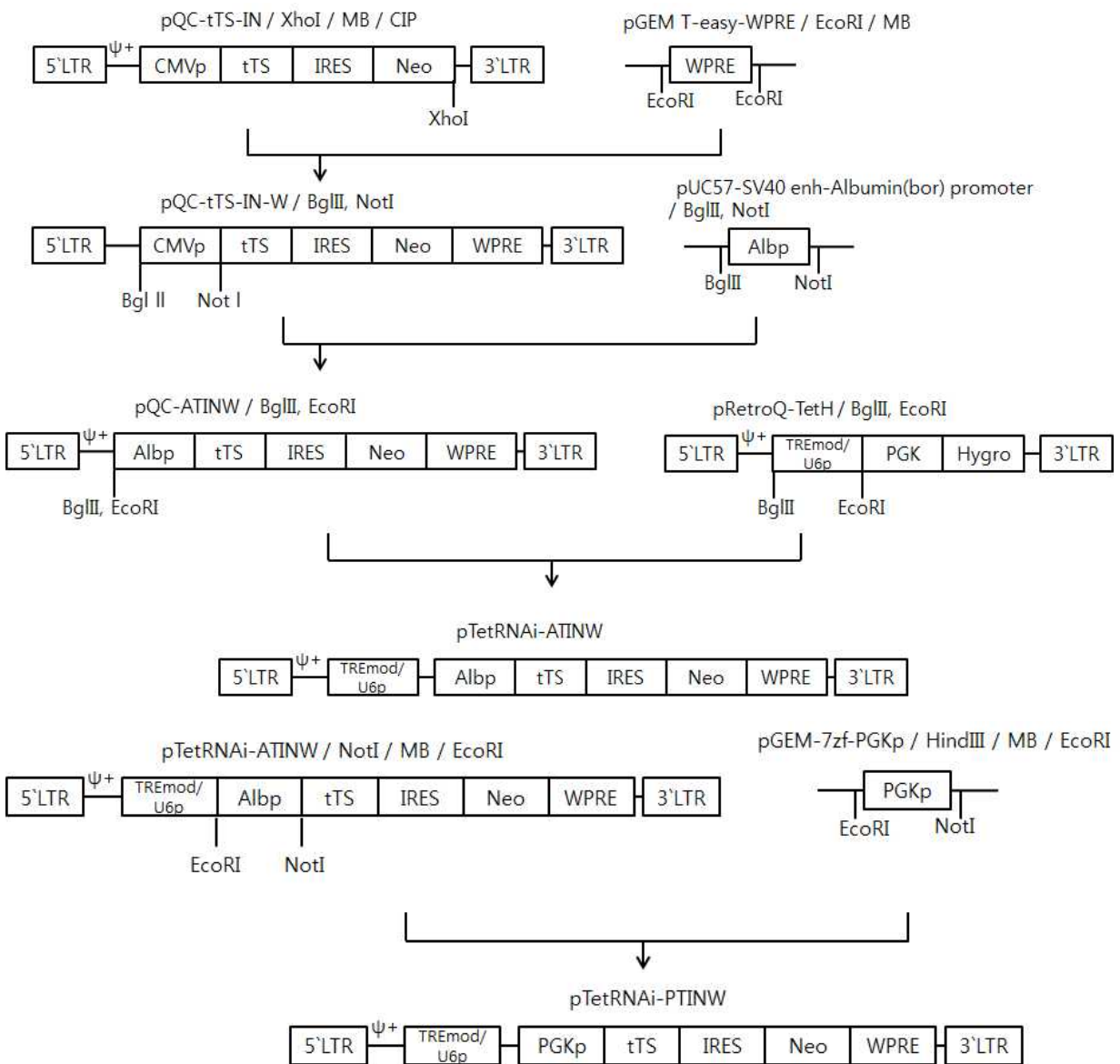


Fig. 36. Strategies of pTetRNAi-ATINW and pTetRNAi-PTINW retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; CMV promoter, cytomegalovirus promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo,

neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; Albp, albumin promoter; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; Albp, albumin promoter; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; Hygro, hygromycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

구축된 pTetRNAi-PTINW와 pTetRNAi-ATINW vector에 cIGF-1 shRNA 서열을 도입하고자 하였다. cIGF-1 유전자 발현을 knock-down시키기 위한 shRNA인 cIGF-1i는 pTetRNAi-PTINW에 도입하였으며 최종적인 vector 구조는 Fig. 37과 같다.

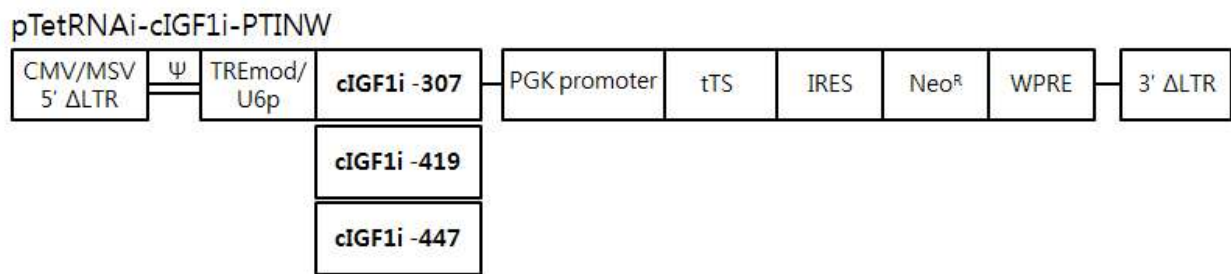


Fig. 37. Construction of pTetRNAi-cIGF1i-PTINW retrovirus vectors. CMV/MSV LTR, cytomegalovirus/mouse sarcoma virus hybrid promoter long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cIGF1i, chicken IGF-1 shRNA; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo^R, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

② cIGF-1 shRNA를 도입한 Tet vector system의 knock-down 효율 검증

구축한 vector가 도입된 각각의 표적세포에서 cIGF-1과 cGHR shRNA에 의한 각 유전자 발현의 knock-down 효율을 검증하기 위한 *in vitro* 실험을 실시하였다. Retrovirus의 생산 및 표적세포로의 감염, total RNA의 추출과 quantitative real-time PCR 실험 기법은 SIREN-RetroQ-shRNA와 동일한 방법을 사용하였다. 본 실험에 사용된 vector의 경우 Tet-system이 적용된 shRNA vector이므로 각 세포에서 cIGF-1 shRNA의 발현이 유도적으로 조절되는 지를 알아보기 위해 발현 유도 물질인 doxycycline을 1 µg/ml의 농도로 72시간동안 처리하였다. 실험에 사용된 doxycycline은 tetracycline의 유도체로서 적은 양으로도 발현 유도 효율이 높은 물질로 알려져 있으며(Cunningham 등, 1997), 실험에 사용한 doxycycline의 최적 농도(1 µg/ml)는 Urlinger 등 (2000)의 보고와 본 연구자의 예비 실험을 통해 결정하였다. TetRNAi-cIGF1i-307, 419, 447-PTINW 세포에서 *cGAPDH* 유전자에 대한 *cIGF-1* 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과 효율이 87.5%, 84.5%, 91.8% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었고, doxycycline에 의한 유도적인 shRNA 발현 조절이 이루어져서 cIGF-1 유전자의 발현이 knock-down 되고 있음을 알 수가 있었다(Fig. 38). 이상의 결과를 종합하여 볼

때, doxycycline을 72시간 처리한 후 cIGF-1 shRNA 중에서는 TetRNAi-cIGF1i-447-PTINW에서 가장 높은 91.8%의 발현 억제 효율이 나타났다. 따라서 *in vivo* 실험 시 cIGF-1 유전자의 발현 억제율이 가장 높은 cIGF-1i-447 shRNA가 도입된 Tet vector를 선택하여 적용하고자 하였다.

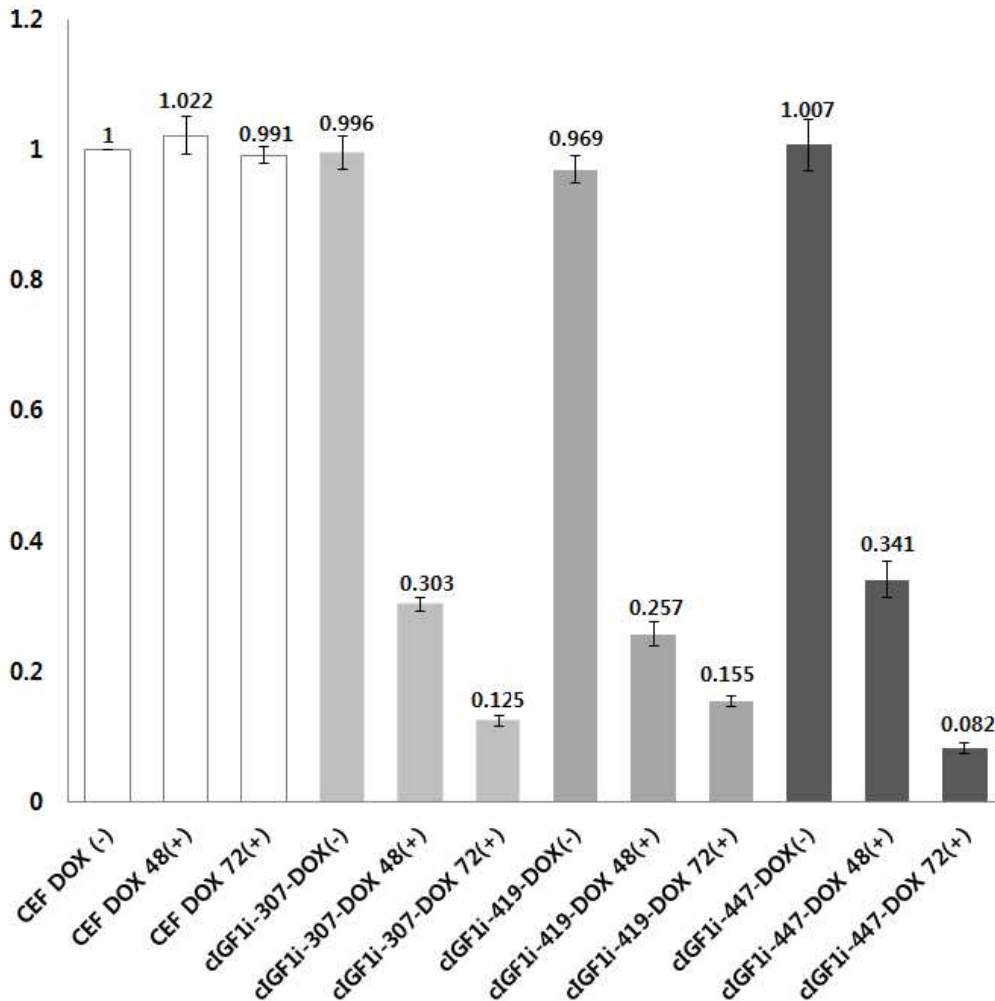


Fig. 38. Efficiency of cIGF-1 knock-down using cIGF-1 shRNA in CEF-TetRNAi-cIGF1iPTINW cells. Dox (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; Dox (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hrs or 72 hrs.

CEF-TetRNAi-cIGF1i-PTINW 세포주들을 이용하여 cIGF-1 shRNA에 의한 *cIGF-1* 유전자 발현의 knock-down 효율을 단백질 수준에서 검정하고자 하였다. 이에 tetracycline 계열의 물질에 의한 cIGF-1 shRNA의 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 CEF-TetRNAi-cIGF1i-PTINW 세포를 doxycycline이 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가된 배양액에서 72 시간동안 배양하였다. 각 세포에서 ELISA 실험에 사용할 배양액을 수확하여 0.45 μm pore size의 cellulose acetate filter로 여과하였다. ELISA 실험은 CUSABIO (China)사의 제품인 chicken IGF-1 ELISA kit을 사용하였으며 실험 과정은 다음과 같다. cIGF-1 primary antibody

가 pre-coating되어 있는 microplate well에 serial dilution해 둔 standard와 배양액을 50 μ 씩 더한 후 각 well에 50 μ 의 conjugate를 더해 주었다. 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후, 각 well의 반응액을 제거하고 wash buffer로 3회 반복하여 수세하였다. 수세한 각 well에 HRP-avidin을 각각 50 μ 씩 더하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 세척을 실시하고, 각각의 well에 substrate를 50 μ 씩 더하여 빛이 차단된 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 종결되도록 stop solution 50 μ 를 각 well에 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 OD 값을 측정하였다. 실험 결과, cIGF-1 shRNA 중에서 cIGF-1i-447에 의한 *cIGF-1* 유전자 발현의 knock-down 효율이 69% 정도인 것으로 확인되었다. 이에 비해 다른 cIGF-1 shRNA의 knock-down 효율은 매우 저조한 것으로 확인되었다(Fig. 39). 따라서 cIGF-1i-447 shRNA를 후속 실험에 사용하고자 하였다.

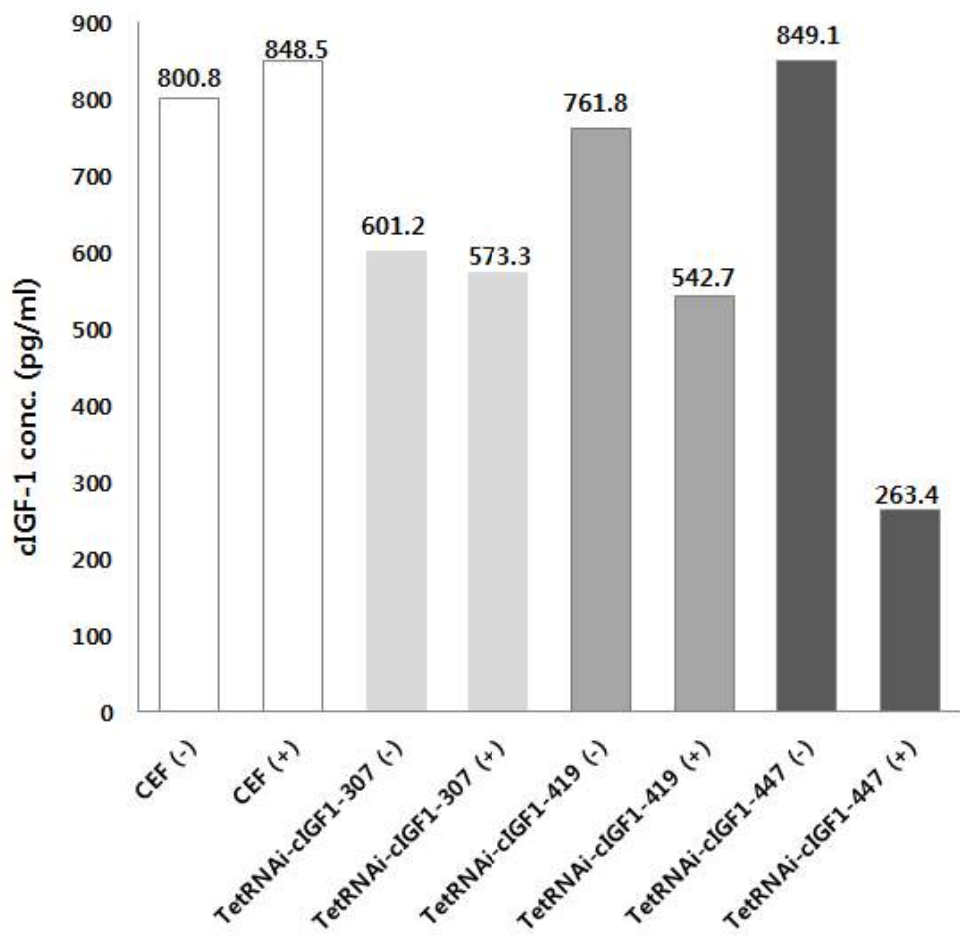


Fig. 39. ELISA analysis of cIGF-1 knock-down efficiency using cIGF-1i shRNA in CEF-TetRNAi-cIGF1i-PTINW cells. Doxy (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs Doxy (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml) for 72 hrs.

(라) pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector system 구축

① pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector의 구축

전단계 연구에서 구축한 SIN vector 형태의 pTetRNAi-cIGF1i-PTINW를 simple retrovirus vector 형태인 pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW로 재조합하였다. 이 vector는 virus 생산 세포주를 미리 구축하여 둔 후, virus 생산 시에만 virus envelope 유전자가 포함되어 있는 pVSV-G를 일시적으로 transfection하면 되므로 SIN vector에 비해 virus 생산이 용이하다. 이 vector의 구조를 살펴보면 항생제 선별 유전자로 neomycin 저항성 유전자가 존재하며 PGK promoter의 조절 하에 tTs 서열이 도입되어 있고 TREmod/U6p promoter 조절 하에 cIGF-1 shRNA 서열이 도입된 형태로 형질전환 개체 내에서 평상시에는 shRNA의 발현이 억제되어 있다가 필요시에만 발현을 turn on시켜서 cIGF-1의 발현을 저해하여 애완용 소형 닭을 생산할 수 있는 구조이다. 이 vector의 재조합 과정을 살펴보면, 먼저 본 연구실에 있는 pLNCXW를 Age I 과 Klenow fragment, Sal I 순으로 처리하고 이와 동일한 제한효소로 pGEM-Teasy-tTS vector를 처리하여 분리한 tTS 단편을 재조합함으로써 pLN-tTS-W를 구축하였다. 본 vector를 Hind III, Klenow fragment, 그리고 BamH I 순으로 처리하여 CMV promoter를 제거한 다음, pTetRNAi-cIGF1i-PTINW vector를 Not I, Klenow fragment, 그리고 Bgl II 순으로 처리하여 TREmod/U6 promoter-cIGF-1i-447-PGK promoter에 해당하는 단편을 분리하여 재조합함으로써 pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 구축하였으며 자세한 재조합 과정은 Fig. 40에 도식화하여 나타내었다.

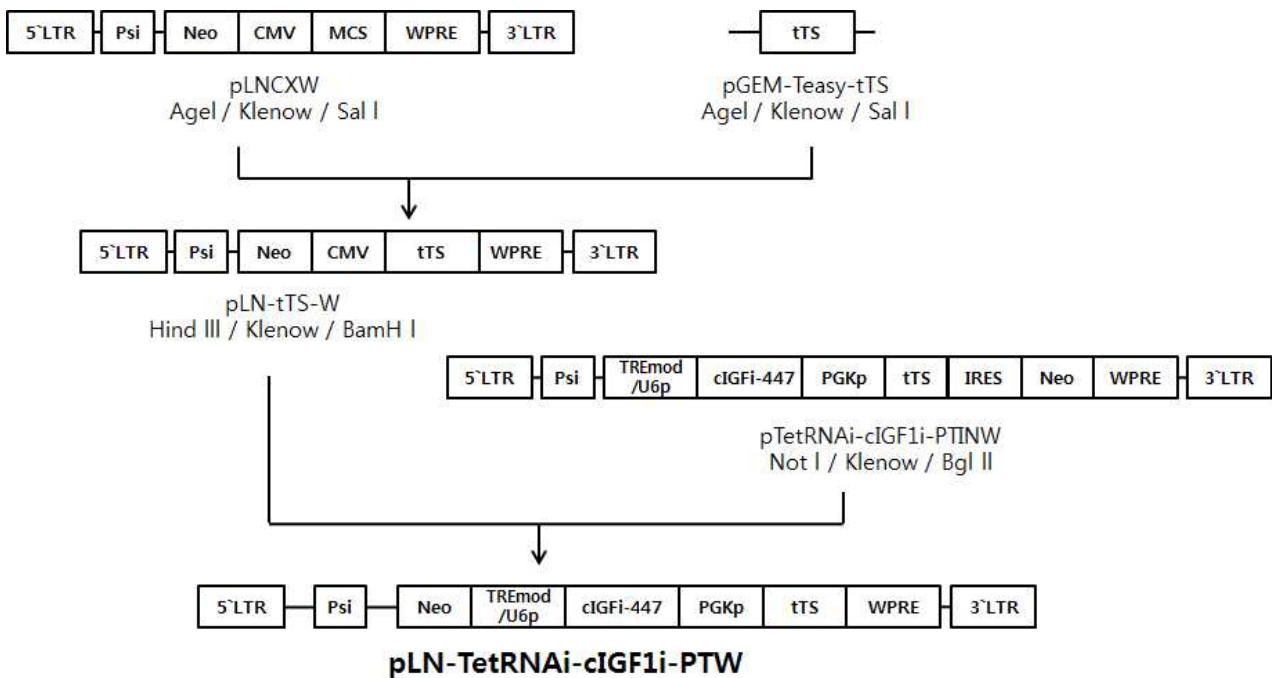


Fig. 40. Strategies of pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo, Neomycin resistant gene; CMV, cytomegalovirus promoter; MCS, multi-cloningsites; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; TREmod/U6p, derived from

modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cIGF-i-447, chicken IGF-1 shRNA; IRES, internal ribosome entry site. Length of each sequence is not drawn to scale.

② cIGF-1 shRNA를 도입한 MoMLV-Tet vector system의 *in vitro*에서의 knock-down 효율 검증

구축한 vector의 *in vitro* 활성 확인을 위한 실험은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 먼저 cIGF-1 shRNA 서열이 내재된 retrovirus를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 600 µg/ml의 농도로 G418 (Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 GP2 293-pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW 세포주를 확립하였다. 확립한 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 48시간이 경과된 후 생성된 virus를 수확하였으며, 이 virus를 CEF 세포에 감염시켰다. 다음날부터 G418 (600 µg/ml)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. Tetracycline 계열의 물질에 의한 cIGF-1 shRNA의 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 virus에 감염된 각각의 CEF 세포를 1 µg/ml의 농도로 doxycycline이 첨가된 배양액에서 48시간과 72시간동안 배양한 후 각 세포로부터 quantitative real-time PCR에 사용할 RNA를 TRI reagent (TaKaRa, Japan)로 처리하여 분리하였다. Quantitative real-time PCR 실험에 사용한 primer는 *cIGF-1* 유전자에 특이적인 primer와 대조구로서의 cGPAPDH에 대한 primer를 사용하였으며(Table 4), SIREN-RetroQ-shRNA 관련 실험과 동일한 방법으로 실시하였다. 실험 결과, virus를 감염시키지 않은 CEF 세포에서는 배양 시간이나 doxycycline의 첨가 여부에 상관없이 발현 양상의 변화가 나타나지 않은데 반해, virus에 감염된 세포주에서는 doxycycline을 첨가한 배양액으로 배양한 시간에 따라서 발현 억제가 66.7%와 72.5%로 점차적인 증가 양상을 나타내었다 (Fig. 41). 이에 본 vector는 *cIGF-1* 유전자의 발현을 유도적으로 knock-down 시키기에 적절한 vector인 것으로 확인되었다.

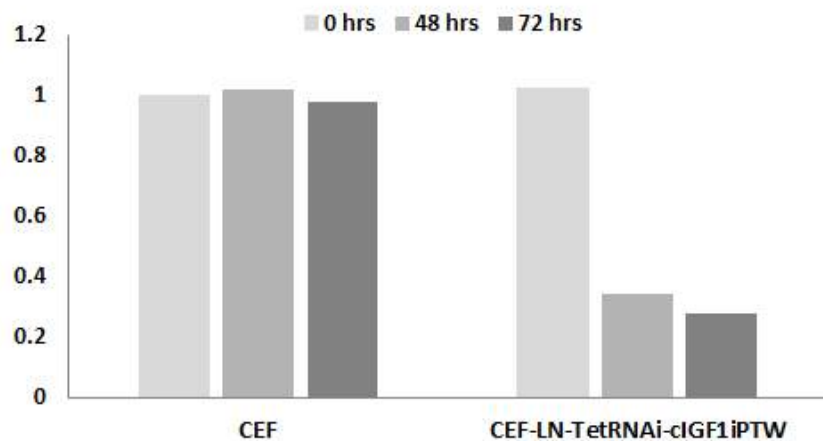


Fig. 41. Efficiency of cIGF-1 knock-down using cIGF-1i shRNA in CEF-LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW cells. 48 hrs and 72 hrs, cells were grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml) for 48 hrs and 72 hrs.

(마) pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector system 구축

① pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector의 구축

전단계에서 구축한 SIN vector 형태의 pTetRNAi-cIGF1i-PTINW vector 구조 중 transcriptional suppressor로 작용하여 외래 유전자의 발현을 조절하는 tTS 대신에 강력한 transactivator로 유도물질에 대한 민감성이 크고 background activity가 매우 적은 것으로 알려진 서열인 rtTA2^SM2 서열을 도입하여 vector를 구축하고자 하였다. 본 연구실의 기존 실험 결과에서도 tTS 서열에 비해 rtTA2^SM2 서열을 도입한 경우 turn on의 조건에서 외래 유전자의 발현이 더욱 강하게 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 IRES와 neomycin 저항성 유전자 부분을 제거하여 전체적인 vector size를 축소하고자 하였다. 재조합 과정을 자세히 살펴보면, 먼저 본 연구실에 있는 pTet2-GPTW를 Not I 과 Klenow fragment, Bgl II 순으로 처리하여 TREtight 서열과 EGFP 유전자를 제거하였다. 동시에 pTetRNAi-cIGF1i-PTINW vector를 EcoR I 과 Klenow fragment, Bgl II 순으로 처리하여 TREmod/U6 promoter 부분과 cIGF-1i-447 서열을 분리하였다. 전자의 TREtight 서열과 EGFP 유전자를 제거한 위치에 TREmod/U6 promoter-cIGF-1i-447 단편을 도입하여 pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 구축하였으며 자세한 재조합 과정은 Fig. 42에 도식화하여 나타내었다.

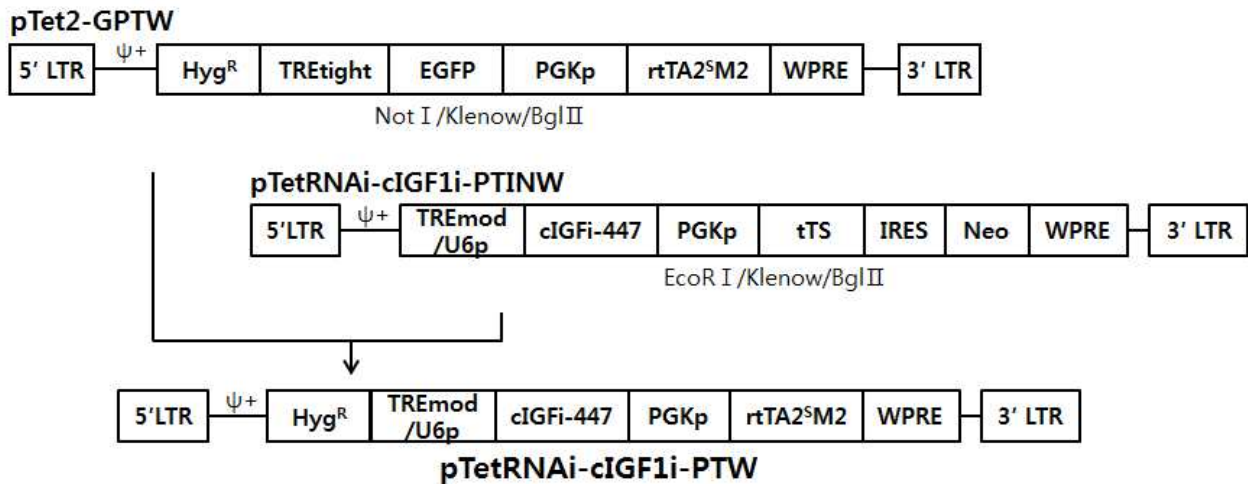


Fig. 42. Strategies of pTetRNAi-cIGF1i-PTW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Hyg^R, Hygromycin B resistant gene; TREtight, is a modified Tet response element, which consists of seven direct repeats of a 36-bp sequence and 19-bp tet operator sequence; EGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene; PGKp, phosphoglycerate kinase-1 promoter; rtTA2^SM2, modified rtTA consisting of the reverse tetracycline repressor (rTet-R) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; cIGF-i-447, chicken IGF-1 shRNA; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo, neomycin resistant gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pTetRNAi-cIGF1i-PTW retrovirus vector system의 *in vitro*에서의 cIGF-1 유전자 발현의 knock-down 효율 검정

구축한 vector의 *in vitro* 활성 확인을 위한 실험은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 먼저 cIGF-1 shRNA 서열이 내재된 retrovirus를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 150 µg/ml의 농도로 hygromycin (Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 GP2 293-pTetRNAi-cIGF1i-PTW 세포주를 확립하였다. 확립한 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 48시간이 경과된 후 생성된 virus를 수확하였으며, 이 virus를 전날에 60 mm dish 상에 1×10^6 개만큼 준비한 CEF 세포에 감염시켰다. 2주간 hygromycin이 첨가된 배양액으로 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. Tetracycline 계열의 물질에 의한 cIGF-1 shRNA의 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 virus에 감염된 각각의 CEF 세포를 1 µg/ml의 농도로 doxycycline이 첨가된 배양액에서 48시간과 72시간동안 배양한 후 각 세포로부터 quantitative real-time PCR 사용할 RNA를 분리하였다. Quantitative real-time PCR 실험에 사용한 *cIGF-1* 유전자에 대한 특이적인 PCR primer와 대조구로서의 cGPAPDH에 대한 primer는 전 실험과 동일한 것을 사용하였다. 실험 결과, virus를 감염시키지 않은 CEF 세포에서는 배양 시간이나 doxycycline의 첨가 여부에 상관없이 발현 양상의 변화가 나타나지 않은데 반해, virus에 감염된 세포주에서는 doxycycline을 첨가한 배양액으로 배양한 시간에 따라서 발현 억제가 48시간과 72시간 배양 조건에서 각각 75.9%와 90.9%로 나타나서 점차적인 증가 양상을 보였다(Fig. 43). 이상의 실험 결과로, 본 vector는 *cIGF-1* 유전자의 발현을 knock-down 시키기 위한 실험에 적용 가능한 vector임을 확인할 수 있었다.

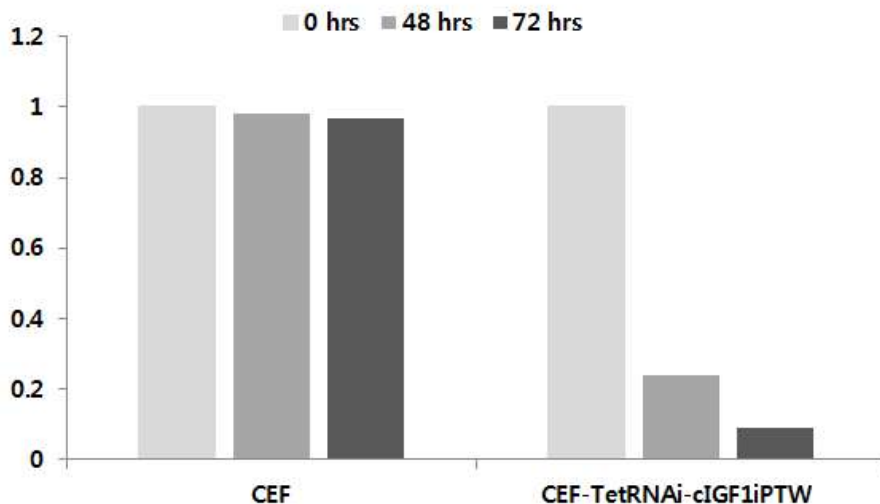


Fig. 43. Efficiency of cIGF-1 knock-down using cIGF-1i shRNA in CEF-TetRNAi-cIGF1i-PTW cell. 0 hrs, cells were not grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml); 48 hrs and 72 hrs, cells were grown in the media supplemented with doxycycline for 48 hrs and 72 hrs.

(바) pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector system 구축

① pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector의 구축

본 연구에서는 cIGF-1 shRNA를 FIV vector에도 도입하고자 하였다. 본 연구실의 선행 연구에서 FIV vector는 다른 lentivirus vector system을 사용하여 유전자를 전이시킨 경우보다 형질전환 닭에서의 외래 유전자의 발현이 잘 되는 것으로 확인되었다. 또한 MoMLV 계통의 retrovirus vector system을 이용하여 형질전환 동물을 개발하는 연구에서 도입된 유전자의 일부가 소실되는 사례가 보고되고 있는데 이를 보완하기 위한 방법 중의 하나가 lentivirus vector system을 사용하는 것이다. 이에 cIGF-1 shRNA를 FIV vector에 도입하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. Vector의 구축 과정은 Fig. 44와 같다. 구축한 pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW도 pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector system과 마찬가지로 형질전환된 세포나 개체에서 cIGF-1 shRNA의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 구조이다.

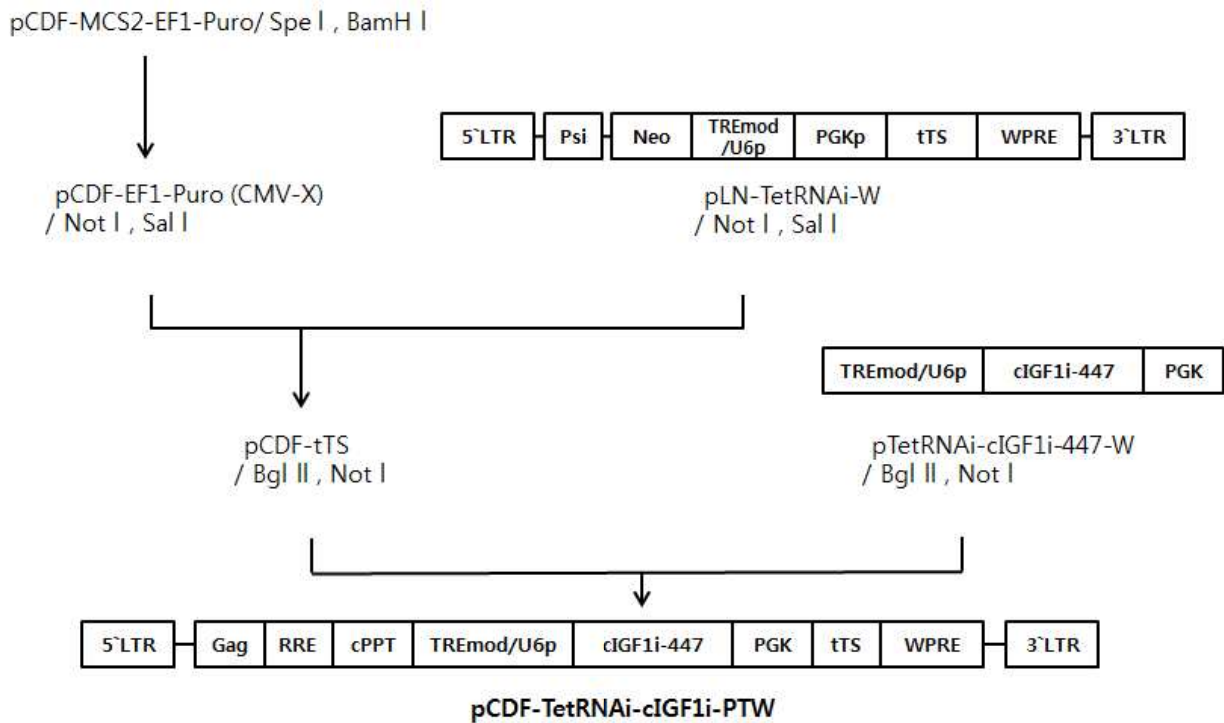


Fig. 44. Strategies of pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW lentivirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; PGK promoter, phosphoglycerate kinase-1 promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; cIGF-i-447, chicken IGF-1 shRNA; Gag, Gag protein gene; RRE, Rev response element; cPPT, central polypurine track. Length of each sequence is not drawn to scale.

② pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW lentivirus vector system의 *in vitro*에서의 cIGF-1 유전자 발현의 knock-down 효율 검정

구축한 pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW를 이용한 lentivirus 생산 및 표적세포로의 감염은 pCDF-TetRNAi-cGHi-PTW를 이용한 실험과 동일한 과정으로 진행하였다. 293FT 세포에 pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW와 pFIV-34N과 pVSV-G로 이루어진 packaging plasmid mix (System Biosciences, USA)를 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하여 virus를 생산한 후 생산한 virus를 CEF 세포에 감염시켰다. Virus를 감염시킨 세포주는 항생제 내성 유전자가 포함되지 않은 관계로 G418 등의 항생제가 첨가되지 않은 배양액에서 3일간 배양한 후 사용하였다. 각 세포주들을 이용한 doxycycline 유도적인 cIGF-1 shRNA의 발현에 의한 *cIGF-1* 유전자의 억제 양상을 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR과 ELISA를 실시하였으며 각 실험 과정은 CEF-TetRNAi-cGHi-PTINW 세포주들을 이용한 실험과 동일하게 진행하였다. 먼저 real-time PCR 실험 결과에서는 63.9% ($100 - (100 \times 0.304 / 0.841)$)의 억제 효율을 보였으며(Fig. 45), ELISA 실험에서는 60.3% ($100 - (100 \times 362 / 911)$)의 억제 효율을 나타내었다(Fig. 46). 이러한 결과는 pLN-TetRNAi-cIGF-1i-PTW vector를 이용한 실험에서 나타난 값에 비해 낮은 수치이나 항생제 선별 과정을 거치지 않은 세포라는 점을 감안해 보면 긍정적인 결과인 것으로 판단된다.

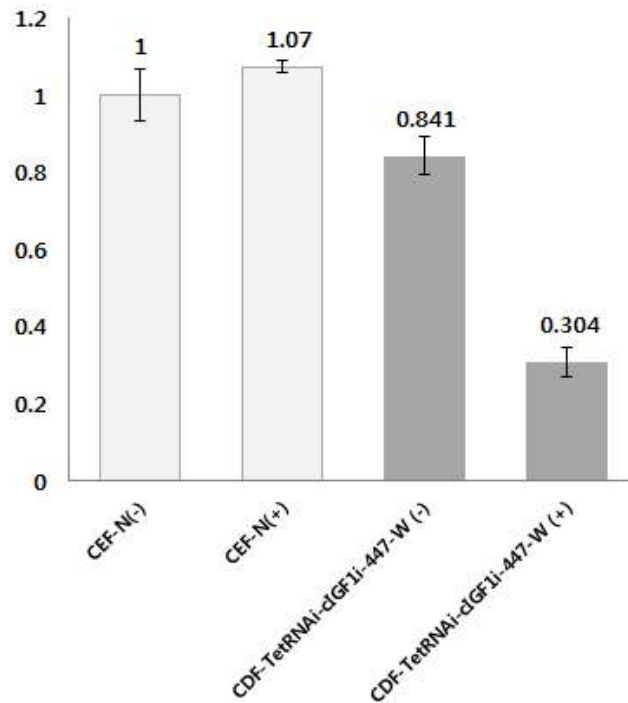


Fig. 45. Quantitative real-time PCR analysis of cIGF-1 knock-down efficiency using cIGF-1 shRNA in CEF-CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW cells. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml) for 72 hrs.

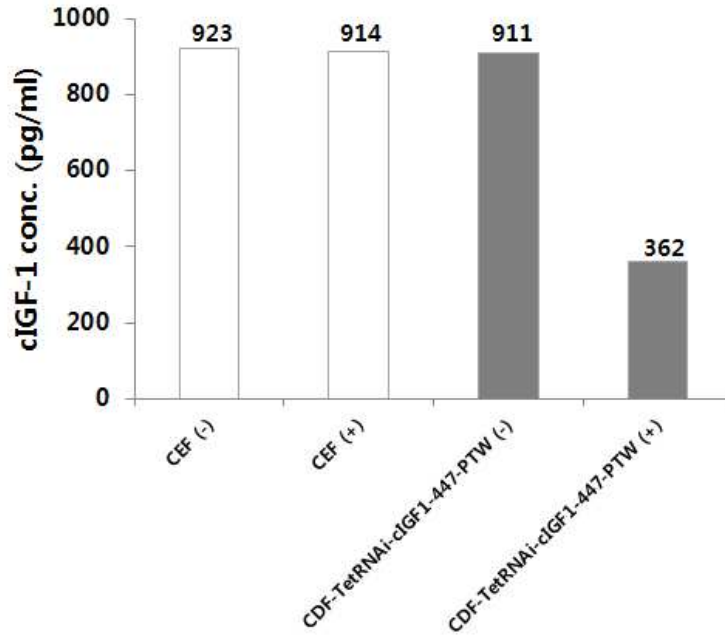


Fig. 46. ELISA analysis of cIGF-1 knock-down efficiency using cIGF-1 shRNA in CEF-CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW cells. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 72 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 hrs.

2. 체성장 관련 유전자에 대한 shRNA를 도입한 형질전환 닭의 생산

가. cGHR shRNA가 도입된 형질전환 닭의 생산

(1) pTetRNAi-cGHRI-ATINW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

In vitro 실험에서 cGHR 유전자 발현의 knock-down 효율이 가장 높은 것으로 확인된 cGHR shRNA 1831이 도입된 vector인 pTetRNAi-cGHRI-1831-ATINW를 이용하여 계란의 배반엽층에 미세주입하기 위한 고농도의 virus를 생산하고자 하였다. 먼저 GP2 293에 pTetRNAi-cGHRI-ATINW를 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 이 첨가된 배양액으로 2주간 배양하여 vector가 전이된 세포주를 구축하였다. 이 세포주에 pVSV-G를 transfection하여 48시간 후 virus를 수확하였으며, 이를 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용하여 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 초원심분리하는 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축된 virus stock은 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다. 이 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입한 후 대리난각 방법(ex-ovo culture system)을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 먼저 대리난각으로 이용하기 위한 계란은 둔단부를 직경 3.4 cm로 절단한 후 증류

수로 수세한 후 건조시켜 두었다. 본 실험에 사용된 유정란은 하이브라운 산란계종으로, $60\pm 3\text{g}$ 무게의 종란을 선택하였다. 부화를 시작하지 않은 종란(stage X)을 파각하여 내용물을 대리난각으로 옮긴 후 본 연구실에서 계량한 manipulator와 특수가공한 microinjection pipette (SIGMA, pipette, microcapillary, $50\ \mu\text{l}$, $100\ \text{mm}$ length)을 이용하여 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene이 첨가된 virus stock $3\ \mu\text{l}$ 를 계란의 배반엽층에 미세주입하였다. Virus의 주입이 끝난 후 배양 전날 준비해 둔 가온한 수양성 난백으로 대리난각을 완전히 채운 후 wrap으로 밀봉하여 37.7°C 의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 15분 주기로 90° 각도로 전란시키면서 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 종란의 무게보다 약 25g 정도 더 무거운 계란을 선별하여 둔단부를 4 cm 직경으로 절단한 대리난각으로 내용물을 모두 옮겼다. 다시 wrap으로 밀봉하여 37.7°C 의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30° 각도로 전란시키면서 15일간 배양하였다. 19일째부터는 계란을 37°C 의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양시켰다. 배양하는 동안 10일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부를 관찰하였으며 각 실험군의 부화율과 형질전환율을 조사하였다.

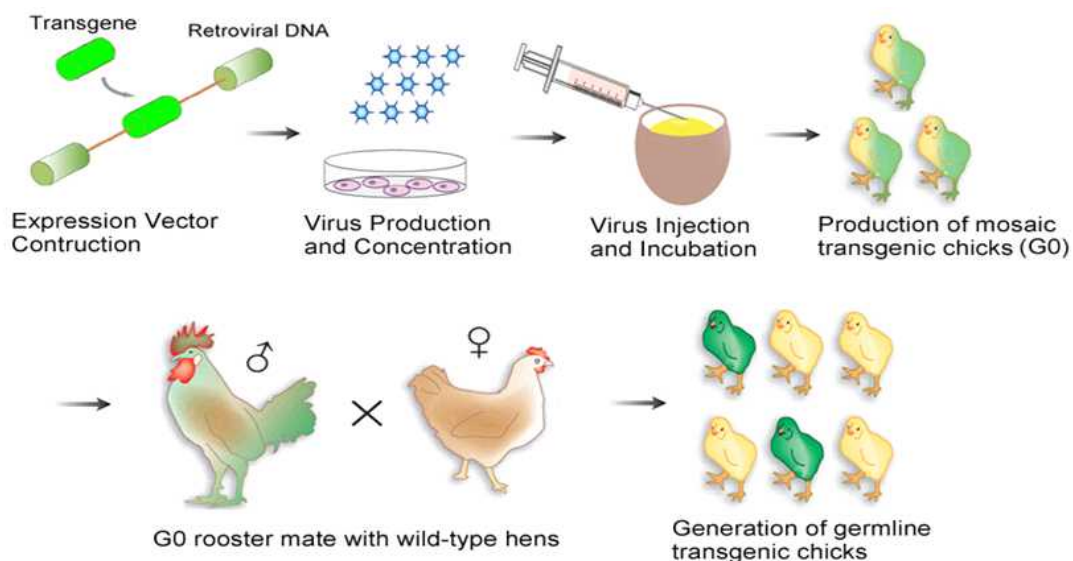


Fig. 47. Surrogate egg-shell culture system for the virus injected chick development from blastoderm formation to hatch.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 cGHRi shRNA 유전자의 전이를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 부화한 지 1개월된 병아리에서 채취한 혈액으로부터 G-DEX II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. Genomic DNA PCR은 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 WPRE, Neomycin 저항성 유전자, 또는 IRES 서열에 대한 PCR을 실시하였으며 정상적인 전사가 일어나고 있음을 확인하기 위한 대조구로 *cGAPDH* 유전자에 대한 PCR도 실시하였다. 또한 개체의 암수 구별을 위해서 CES 유전자에 특이적인 primer로 PCR 반응을 실시하였다. 각 primer는 표 11과 같으며 각 reaction mixture를 94°C 에서 30초(denaturation), $56^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ (annealing temp.

는 각 primer에 따라 상이)에서 30초, 그리고 72°C에서 30초(extension)로 반응하는 과정을 30회 실시하였고 72°C에서 7분간 방치하여 완전한 extension을 유도하였다.

Table 11. Primers used for genomic DNA PCR of TetRNAi-cGHRI-ATINW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
WPRE	5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' (+) 5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)	315	56
Neo ^R	5'-GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGG-3' (+) 5'-GCGATACCGTAAAGCACGAGGAA-3' (-)	494	57
IRES	5'-CCTAGGGGTCTTTCCCCTCT-3' (+) 5'-AGCCCCTTGTGAATACGCT-3' (-)	275	57
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

TetRNAi-cGHRI-ATINW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 3차에 걸쳐 진행되었으며, 부화한 병아리는 모두 74마리이고 이 중 14마리가 형질전환된 G0 개체인 것으로 확인되었다(Table 12).

Table 12. Hatchability of TetRNAi-cGHRI-ATINW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	117	5 (4.3)	4 (80)
2	134	29 (21.6)	1 (3.5)
3	264	40 (15.2)	9 (22.5)
Total	515	74 (14.4)	14 (18.9)

1차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 부화한 5마리 중 4마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 80%로 나타났다(Fig. 48).

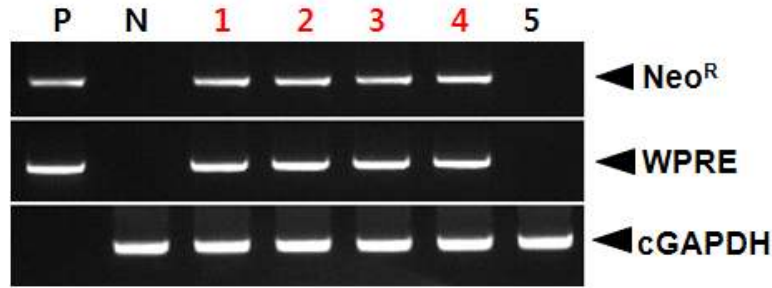


Fig. 48. PCR analyses of G0 TetRNAi-cGHRi-ATINW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 5 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cGHRi-ATINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서는 부화한 개체 수가 29마리로 매우 많았으나 형질전환 개체로 확인된 개체는 한 마리뿐이었다(Fig. 49). 확인된 개체도 병약하여 사망하였으며 현재 생존한 개체는 없다.

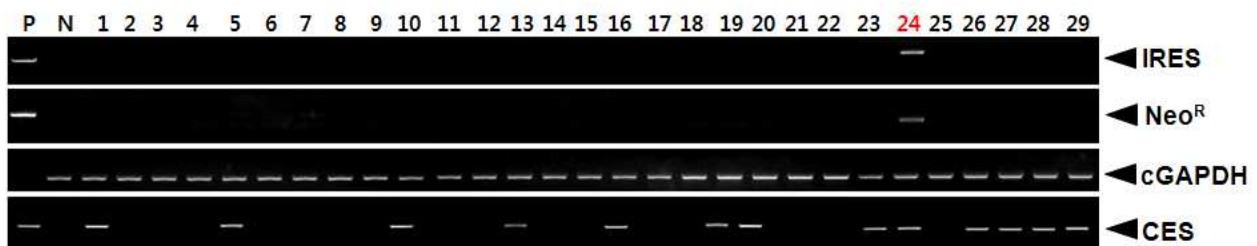


Fig. 49. PCR analyses of G0 TetRNAi-cGHRi-ATINW transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 29 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cGHRi-ATINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에서는 virus를 주입한 264개의 유정란 중에서 40마리의 병아리가 부화하였으며, 이 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 9마리로 현재 수컷 5마리와 암컷 2마리이다(Fig. 50).

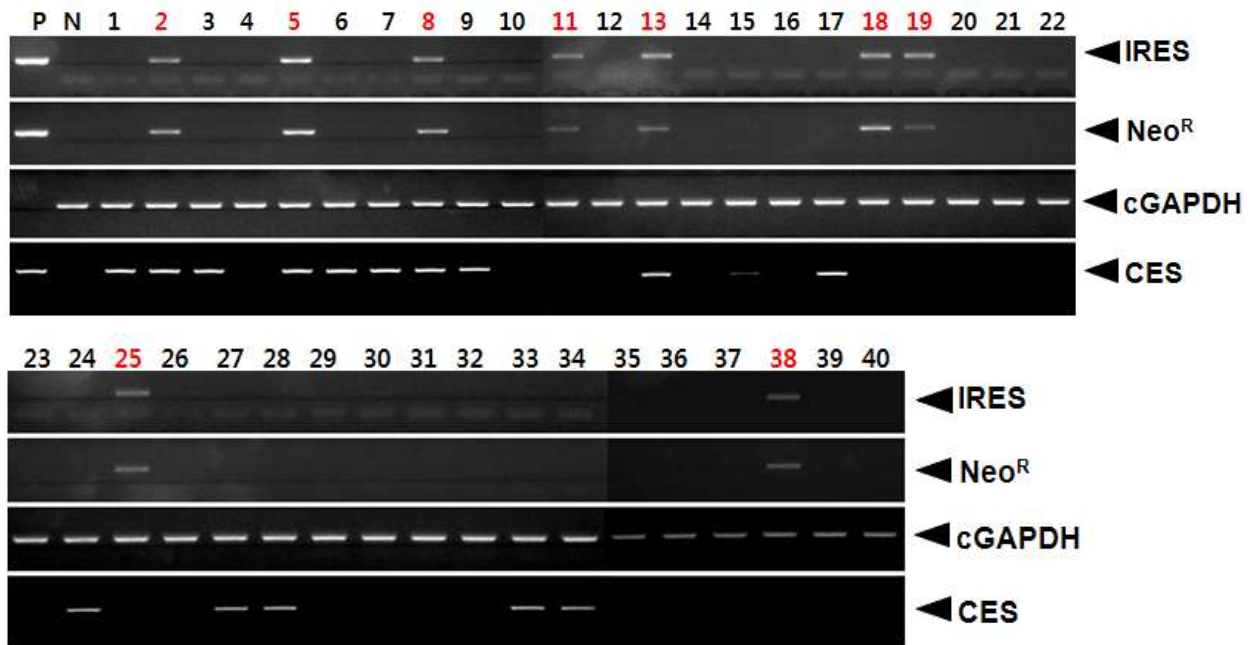


Fig. 50. PCR analyses of G0 TetRNAi-cGHRi-ATINW III transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 40 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cGHRi-ATINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

나. cGH shRNA가 도입된 형질전환 닭의 생산

(1) pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

cGH 유전자의 발현을 knock-down 시키기 위한 virus vector system으로는 cGH 유전자 발현 억제 효율이 가장 높았던 cGH shRNA-525가 도입된 형태를 사용하였다. 첫 번째로 cGH shRNA-525와 rGH promoter의 조절 하에 tTS 서열이 도입된 vector인 pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW vector system을 이용하여 virus를 생산하였다. Virus 생산 과정은 TetRNAi-cGHRi-ATINW 실험과 동일하게 진행하였으며 초원심분리 방법으로 농축한 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법(ex-ovo culture system)을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. Virus를 주입한 유정란은 37.7°C의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에서 배양하였으며, 배양하는 동안 10일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부를 관찰하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 cGH shRNA의 전이를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 부화한 지 1개월된 병아리에서 채취한 혈액으로부터 G-DEX II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. Genomic

DNA PCR은 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 tTS, Neomycin resistance gene에 대한 PCR을 실시하였으며 대조구로 *cGAPDH* 유전자와 개체의 암수 구별을 위해서 *CES* 유전자에 특이적인 primer로 PCR 반응을 실시하였다. 각 primer 서열은 표 13과 같다.

Table 13. Primers used for genomic DNA PCR of TetRNAi-cGHi-rGHpTINW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
tTS	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
Neo ^R	5'-ATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG-3' (+) 5'-ATATCACGGGTAGCCAACGCTATG-3' (-)	217	57
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

TetRNAi-cGHi-rGHpTINW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 1회 진행하였으며, 부화한 49마리의 병아리 중 3마리가 형질전환된 G0 개체인 것으로 확인되었다(Table 14).

Table 14. Hatchability of TetRNAi-cGHi-rGHpTINW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	151	49 (32.5)	3 (6.1)

부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 49마리 중 3마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 6.1%로 나타났으며, 한 마리는 수컷이고 두 마리는 암컷으로 확인되었다(Fig. 51).

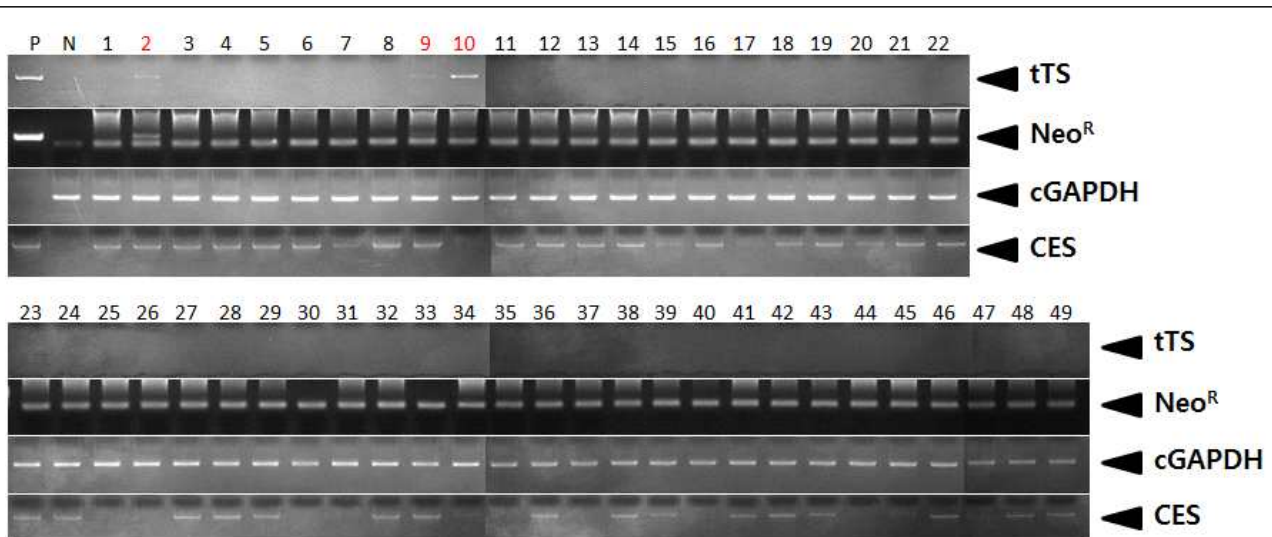


Fig. 51. PCR analyses of G0 TetRNAi-cGHi-rGHpTINW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 49 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(2) pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

두 번째 cGH shRNA 형질전환 닭 생산에 사용한 vector system은 pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW vector system이다. Virus 생산 과정은 TetRNAi-cGHi-rGHpTINW 실험과 동일하게 진행하였으며 초원심분리 방법으로 농축한 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법(ex-ovo culture system)을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 cGH shRNA의 전이를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 부화한 지 1개월된 병아리에서 채취한 혈액으로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 tTS, neomycin 저항성 유전자, psi 서열, 또는 WPRE 서열에 대한 PCR을 실시하였으며 대조 구로 cGAPDH 유전자와 개체의 암수 구별을 위해서 CES 유전자에 특이적인 primer로 PCR 반응을 실시하였다. 각 primer 서열은 표 15와 같다.

Table 15. Primers used for genomic DNA PCR of LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
tTS	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
Neo ^R	5'-ATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG-3' (+) 5'-ATATCACGGGTAGCCAACGCTATG-3' (-)	217	57
psi	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
WPRE	5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' (+) 5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)	315	60
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 10차에 걸쳐 진행되었으며, virus를 주입한 1,627개의 유정란 중에서 부화한 병아리는 모두 147마리이고 이 중 28마리가 형질전환된 G0 개체인 것으로 확인되었다(Table 16).

Table 16. Hatchability of LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	161	2 (1.2)	2 (100)
2	118	3 (2.5)	3(100)
3	243	47 (19.3)	14 (29.8)
4	212	8 (3.8)	0 (0)
5	119	32 (26.9)	8 (25)
6	216	13 (6.0)	0 (0)
7	173	1 (0.6)	0 (0)
8	123	7 (5.7)	1 (14.3)
9	147	27 (18.4)	0 (0)
10	115	7 (6.1)	0 (0)
Total	1,627	147 (9.0)	28 (19.0)

1차 실험군에서는 161개의 유정란에 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus를 미세주입하여 두 마리가 부화하였으며 두 마리 모두 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 52). 모두 암컷으로 확인되었으며 현재는 한 마리만 생존해 있다.

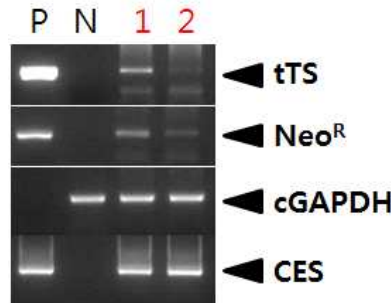


Fig. 52. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 2 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 3마리 모두 형질전환 개체로 확인되었으며 모두 수컷으로 확인되었다(Fig. 53). 이 개체들은 성숙이 완료되는 대로 생식세포에 유전자가 전이된 개체를 재선별한 후 wild type의 암컷과 교미하여 G1 생산을 시도할 예정이었으나 정자에서 외래 유전자의 전이가 확인되지 않았다.

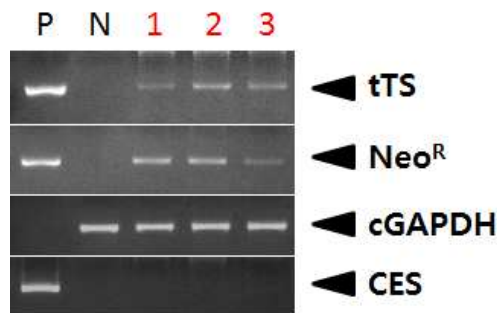


Fig. 53. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에는 47마리가 부화하였으며 이 중 14마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 29.8%로 나타났다(Fig. 54). 이 중 5마리가 수컷이고 나머지는 암컷인 것으로 확인되었다.

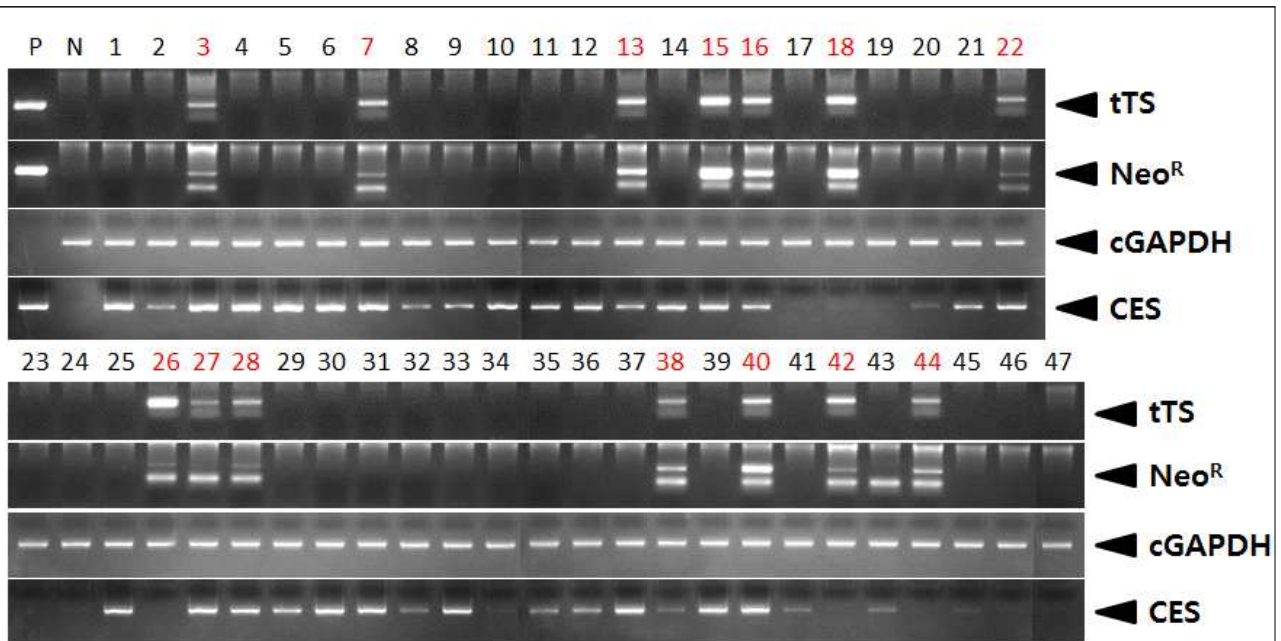


Fig. 54. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 47 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 8마리가 부화하였으나 형질전환 개체는 한 마리도 확인되지 않았다(Fig. 55).

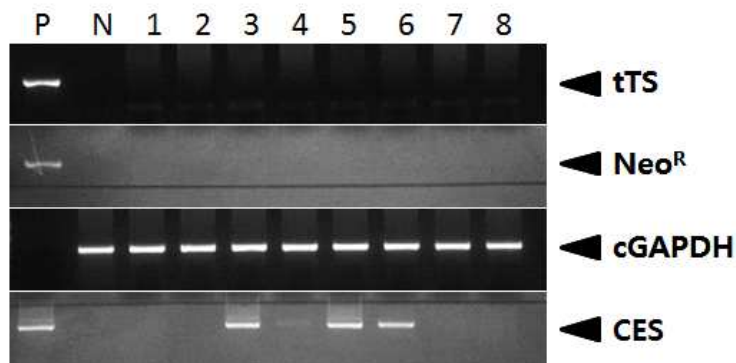


Fig. 55. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 8 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

5차 실험군에서는 32마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 8마리로, 수컷 4마리와 암컷 4마리이다(Fig. 56).

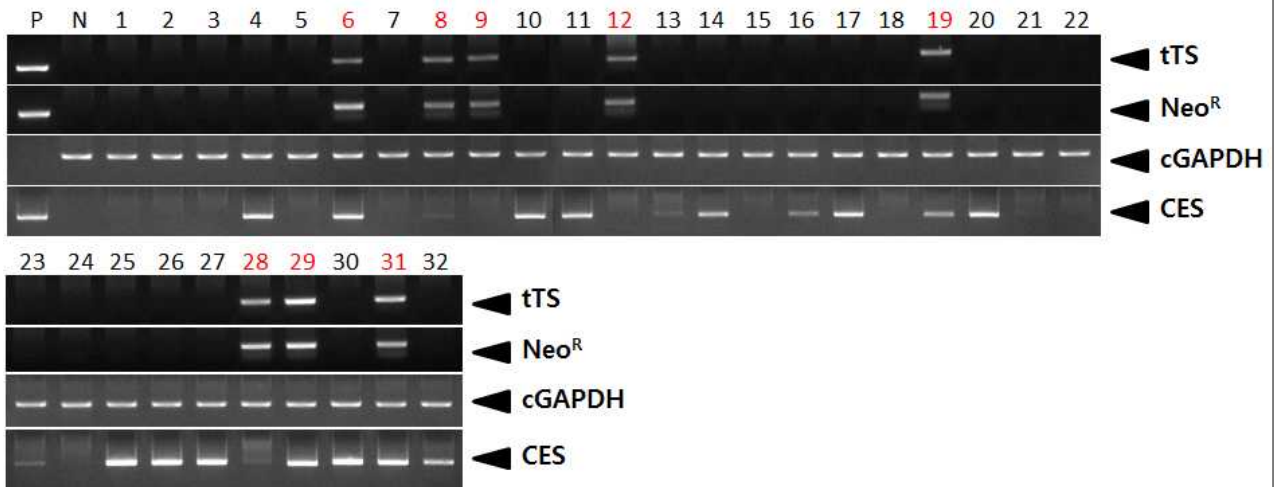


Fig. 56. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the fifth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 32 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

6차 실험군에서는 virus를 주입한 216개의 수정란 중에 13마리가 부화하였으며 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과 형질전환된 개체가 없는 것으로 나타났다(Fig. 57).

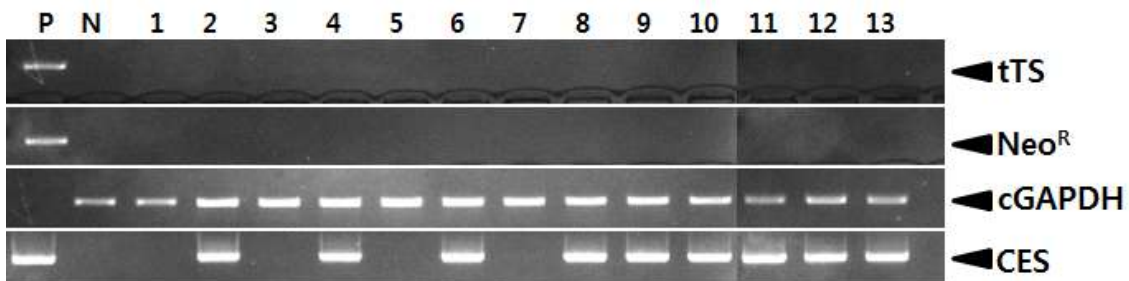


Fig. 57. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the sixth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 13 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

7차 실험에서는 부화율이 매우 저조하여 한 마리만 부화하였으며 이 개체 역시 외래 유전자의 전이가 확인되지 않았다(Fig. 58).

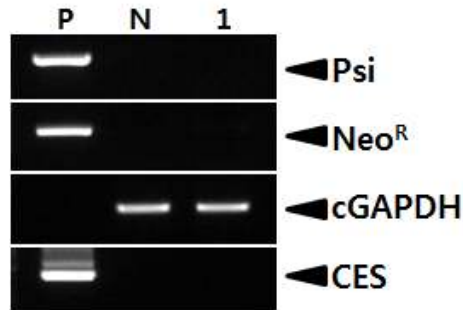


Fig. 58. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the seventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 1 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

8차 실험군에서는 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW virus를 미세주입하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 7마리 중 1마리만 형질전환된 개체로 확인되었으며 수컷으로 확인되었다(Fig. 59).

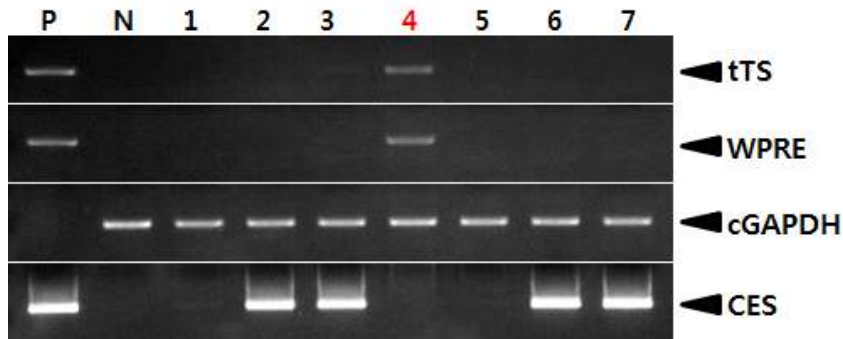


Fig. 59. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the eighth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

9차 실험군에서는 virus를 주입한 147개의 유정란 중에 27마리가 부화하여 약 18.4%의 부화율을 나타내었으나, genomic DNA PCR을 통한 형질전환 개체의 확인에서는 유전자의 전이가 확인된 경우가 없었다(Fig. 60).

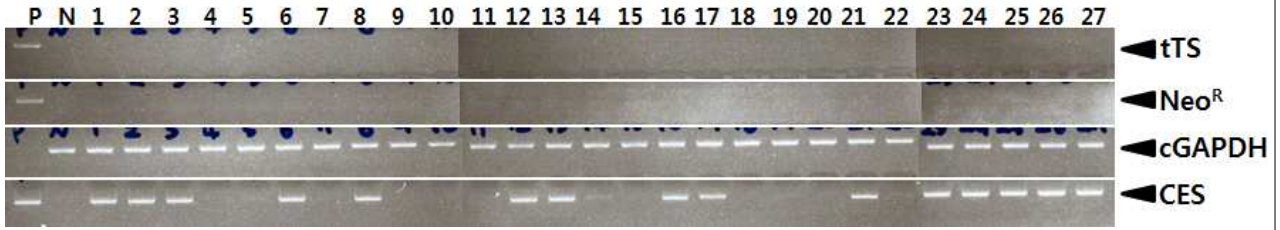


Fig. 60. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the ninth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 27 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

10차 실험군에서도 6.1%의 낮은 부화율을 보였으며 부화한 병아리의 혈액에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 PCR을 실시한 결과, 형질전환 개체는 확인되지 않았다(Fig. 61).

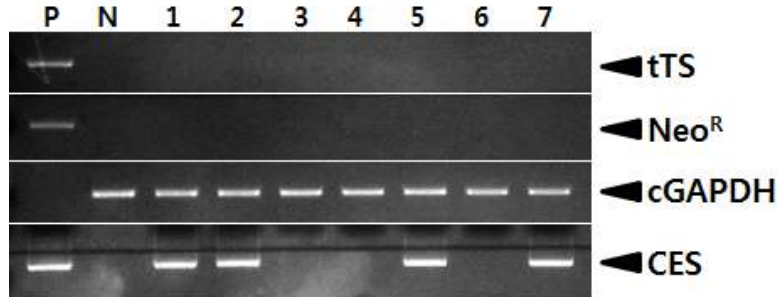


Fig. 61. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chickens in the tenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(다) G0 형질전환 닭의 생식세포에서 cGH shRNA의 전이 여부 확인

LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW 실험군 중 4차 실험군 수컷에서 sperm DNA PCR을 통한 외래 유전자의 전이를 확인하고자 하였다. Sperm의 genomic DNA PCR 실험에서의 genomic DNA PCR 실험에 사용한 primer는 neomycin 저항성 유전자와 tTS 서열에 대한 primer와 대조구로서의 cGAPDH 유전자에 대한 primer를 사용하였다. 실험 결과, 46번 개체에서 PCR 증폭 단편이 일부 확인되었는데, 이 개체는 G0 개체의 혈액에서 실시한 genomic DNA PCR에서는 형질전환이 확인되지 않은 개체이다. 이는 G0 개체가 mosaic 양상을 나타내어 혈액에는 외래 유전자가 전이되지 않고 성세포에 외래 유전자가 전이되었음을 나타내는 것이다. 하지만 vector 상의 일부 서열에 대한 PCR 증폭 단편이 나타나지 않았으며 이는 genomic DNA 상으로 도입된 일부 vector 서열이 deletion된 것으로 추정할 수 있다(Fig. 62). 따라서 이 개체로부터 G1 생산은 재고해 볼 필요가 있을 것으로 판단되었다.

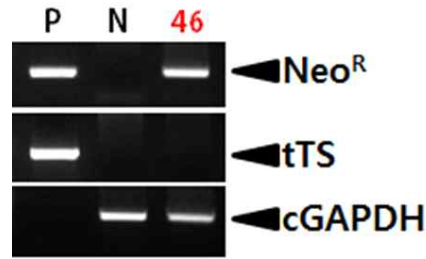


Fig. 62. PCR analyses of sperm DNA in G0 LN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW transgenic chicken. Genomic DNA was isolated from the sperm of one G0 male transgenic chicken and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cGHi-rGHpTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

(3) pTetRNAi-cGHi-PTW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

pTetRNAi-cGHi-PTW vector system을 이용한 virus 생산 과정은 TetRNAi-cGHi-rGHpTINW 실험과 동일하게 진행하였으며 초원심분리 방법으로 농축한 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 cGH shRNA의 전이를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. Genomic DNA PCR은 병아리의 혈액에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 psi 서열과 Hygromycin 저항성 유전자에 대한 PCR을 실시하였으며 정상적인 전사가 일어나고 있음을 확인하기 위한 대조구로 cGAPDH 유전자에 대한 PCR도 실시하였다. 또한 개체의 암수 구별을 위해서 CES 유전자에 특이적인 primer로 PCR 반응을 실시하였다(Table 17).

Table 17. Primers used for genomic DNA PCR of TetRNAi-cGHi-PTW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
psi	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
Hygro ^R	5'-GCTCTCGATGAGCTGATGCTTTG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	208	57
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

TetRNAi-cGHi-PTW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 1회 실시하였으며 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 19마리 중 3마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 15.8%로 나타났으며, 세 마리 모두 수컷으로 확인되었다(Fig. 63).

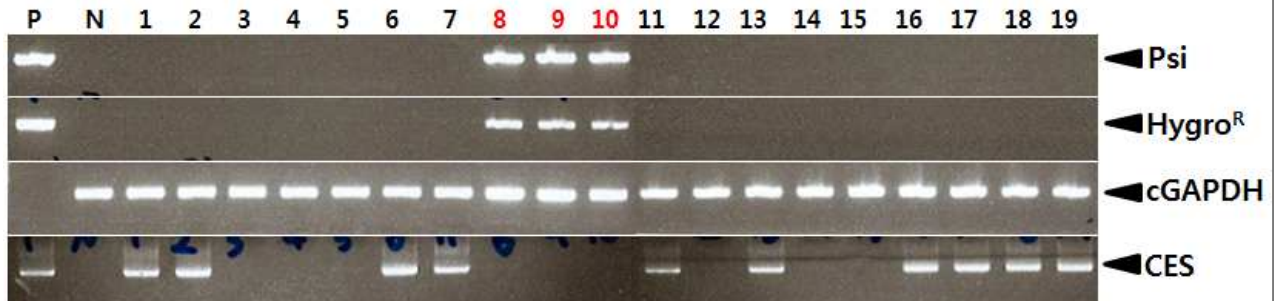


Fig. 63. PCR analyses of G0 TetRNAi-cGHi-PTW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 19 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cGHi-rGHpTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

이상의 cGH shRNA가 도입된 형질전환 닭을 생산하기 위한 실험에서는 전반적으로 저조한 부화율과 형질전환율을 나타내었으며 생산된 대다수의 산자도 일주일 내에 폐사하였다. 또한 G1 생산도 원활하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 비교적 높은 부화율과 형질전환율, 그리고 충분한 수의 G0 형질전환 개체 수가 확보되어 있는 cIGF-1 shRNA 형질전환 닭의 생산 연구에 보다 중점을 두는 것이 더 적절할 것으로 판단되었다.

다. cIGF-1 shRNA가 도입된 형질전환 닭의 생산

(1) TetRNAi-cIGF1i-PTINW 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

cIGF-1 유전자 발현을 억제하기 위한 shRNA로는 *in vitro* 실험에서 억제 효율이 가장 높게 나타난 cIGF-1 shRNA-447을 사용하기로 하였다. 따라서 cIGF-1 shRNA-447이 도입된 pTetRNAi-cIGF1i-PTINW vector를 이용하여 pTetRNAi-cGHRi-PTINW virus를 이용한 실험과 동일한 방법으로 GP2 293 세포와 pVSV-G를 사용해서 고농도의 virus를 생산하였다. 이 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 WPRE, neomycin 저항성 유전자, 그리고 IRES 서열에 대한 primer

이다. TetRNAi-cIGF1i-PTINW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 18차에 걸쳐 진행되었으며, 부화한 병아리는 모두 296마리이고 이 중 77마리가 형질전환된 G0 개체인 것으로 확인되었다(Table 18).

Table 18. Hatchability of TetRNAi-cIGF1i-PTINW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	108	18 (16.7)	9 (50)
2	98	8 (8.2)	2 (25)
3	94	3 (3.2)	2 (66.7)
4	215	9 (4.2)	3 (33.3)
5	139	16 (11.5)	2 (12.3)
6	235	42 (17.9)	3 (7.2)
7	71	2 (2.8)	1 (50)
8	141	23 (16.3)	5 (21.7)
9	171	38 (22.2)	6 (15.8)
10	188	9 (4.8)	7 (77.8)
11	170	20 (11.7)	2 (10)
12	78	28 (35.9)	1 (3.6)
13	104	11 (10.6)	3 (27.2)
14	187	33 (17.6)	18 (54.5)
15	166	13 (7.8)	3 (23.1)
16	168	10 (6)	3 (30)
17	83	3 (3.6)	2 (66.7)
18	136	10 (7.4)	4 (40)
Total	2,552	296 (11.6)	77 (26.0)

첫 번째 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 18마리 중 9마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 50%로 나타났으며, 암컷 2마리와 수컷 7마리로 확인되었다(Fig. 64).

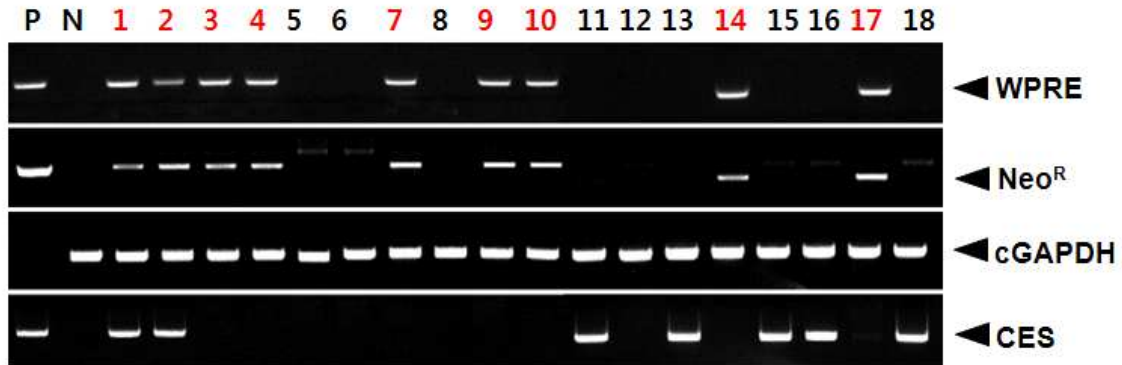


Fig. 64. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 18 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차와 3차 실험군에서는 각각 8마리와 3마리가 부화하였으며 이 중 4마리가 형질전환 개체로 확인되었다. 현재는 3차 실험군의 수컷 한 마리가 생존해 있다(Fig. 65).

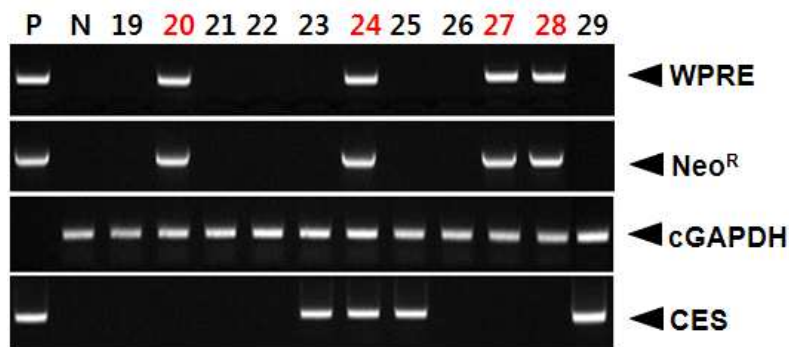


Fig. 65. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the second and third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 11 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 9마리의 부화한 병아리 중 3마리가 형질전환된 개체로 확인되어 약 33.3%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 66). 이 중 암컷 1마리와 수컷 1마리가 생존해 있다.

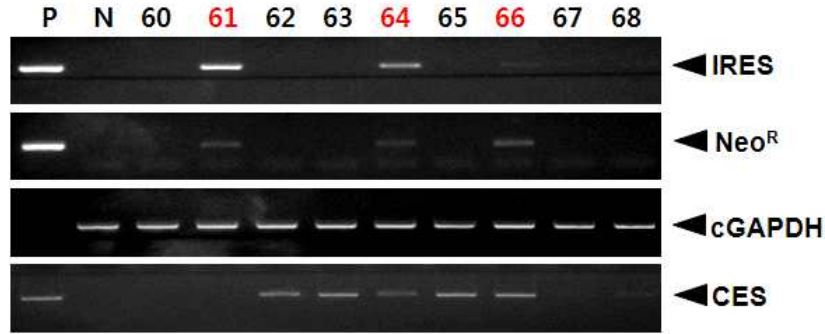


Fig. 66. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 9 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

5차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 16 마리 중 2마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 12.3%로 나타났으며, 두 마리 전부 암컷으로 확인되었다(Fig. 67).

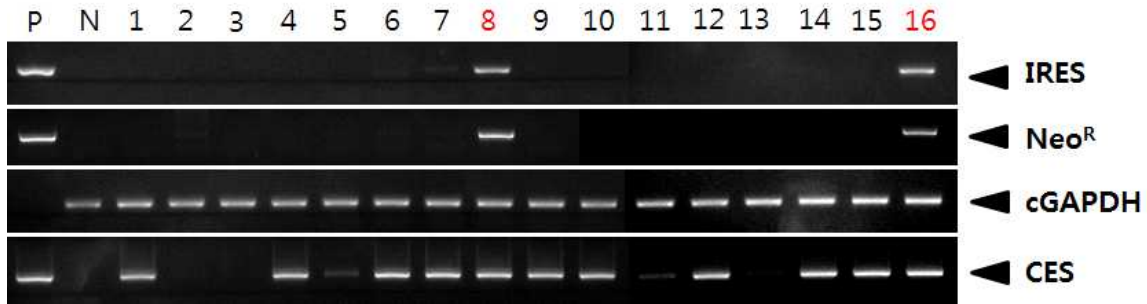


Fig. 67. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the fifth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 16 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

6차 실험군에서는 42마리가 부화하였으며 이 중 3마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 68). 이 중 2마리가 수컷이고 한 마리가 암컷으로 확인되었으며 현재는 폐사하여 생존하고 있지 않다.

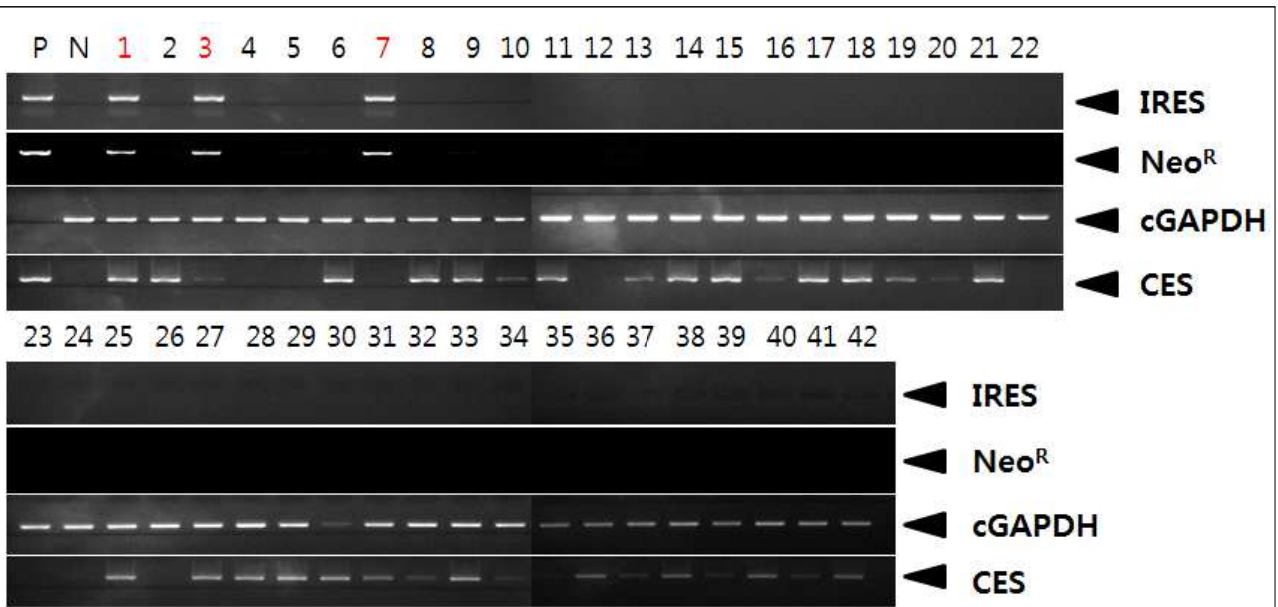


Fig. 68. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the sixth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 42 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

7차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 2마리 중 1마리가 형질전환 개체로 확인되었으며 암컷으로 판명되었다(Fig. 69).

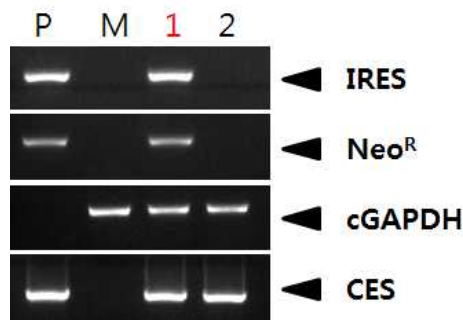


Fig. 69. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the seventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 2 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

8차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 23마리 중 5마리가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 21.7%로 나타났다(Fig. 70). 이 중 3마리가 수컷이고 2마리가 암컷인 것으로 확인되었다.

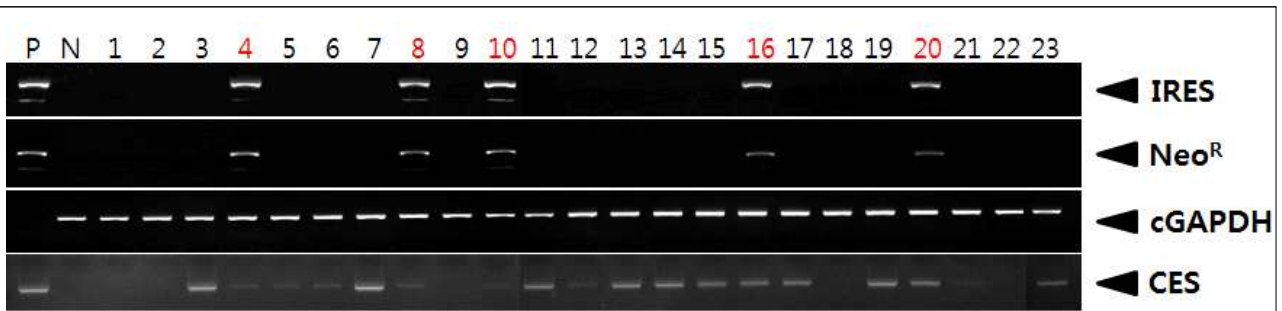


Fig. 70. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the eighth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 23 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

9차 실험군에서는 38마리가 부화하였으며, 이 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 6마리로 현재는 모두 폐사하였으며 혈액에서 유전자의 전이가 확인되지 않은 개체 중 수컷만 사양 중이다(Fig. 71). 이는 배반엽 세포에 virus vector를 감염시키는 시기가 6만 여개의 세포가 존재하는 stage X 시기이므로 혈액 세포가 아닌 다른 체세포나 성세포에 vector가 전이될 가능성이 있기 때문이다. 따라서 수컷의 성숙이 완료된 후에 실험 대상이 된 모든 수컷 개체의 정자에서 genomic DNA PCR을 실시하고자 하였다.

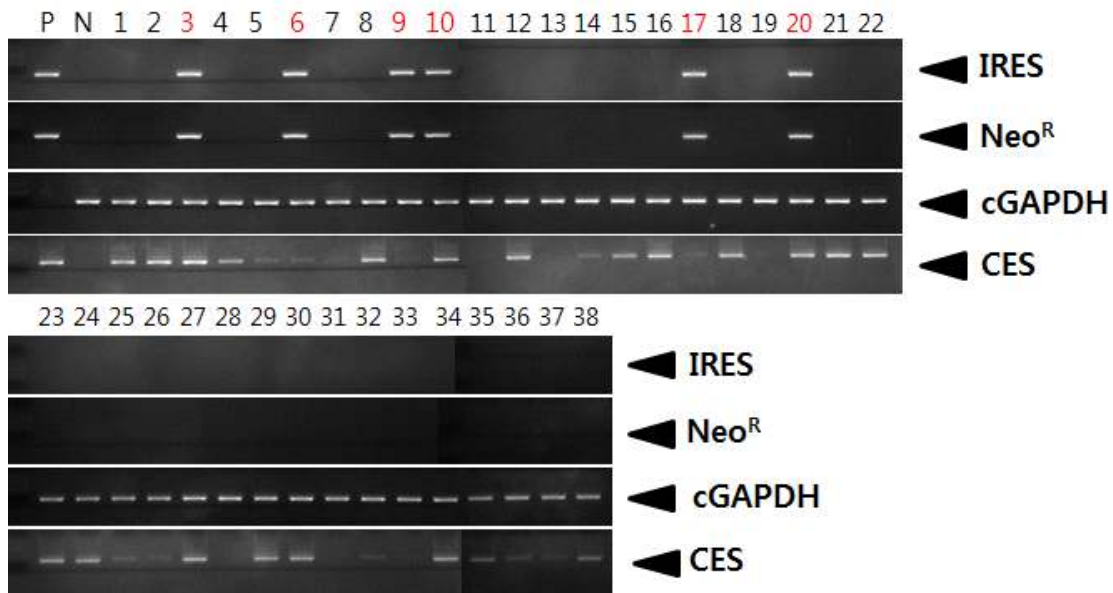


Fig. 71. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the ninth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 38 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

10차 실험군에서는 9마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 7마리로, 수컷은 4마리이고 암컷은 3마리였다(Fig. 72).

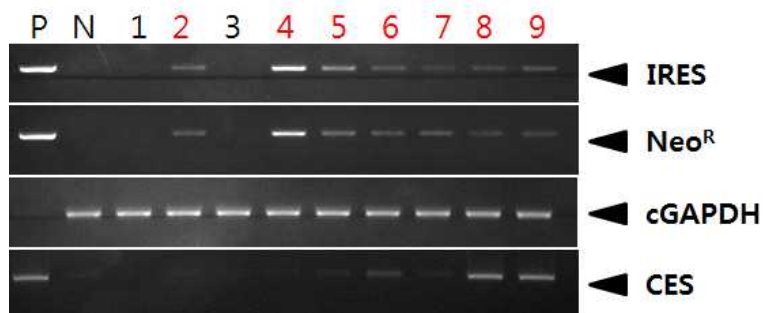


Fig. 72. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the tenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 9 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

11차 실험군에서는 부화한 개체 수가 20마리로 꽤 많았으나 형질전환 개체로 확인된 개체는 두 마리뿐이었다(Fig. 73). 확인된 개체도 병약하여 사망하였으며 현재 생존한 개체는 없다.



Fig. 73. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the eleventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 20 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

12차 실험군에서는 28마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 수컷 1마리로 현재 생존해 있다(Fig. 74). 이 개체는 성숙이 진행된 후 정자에서 genomic DNA PCR을 실시하였으나 외래 유전자의 전이가 확인되지 않았다.

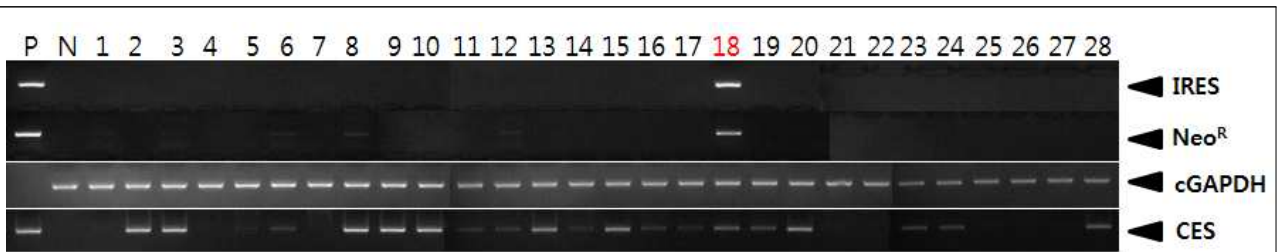


Fig. 74. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the twelfth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 28 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

13차 실험군에서는 11마리의 병아리가 부화하였으며, 이 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 3마리였으며 얼마 지나지 않아서 폐사하였다(Fig. 75).

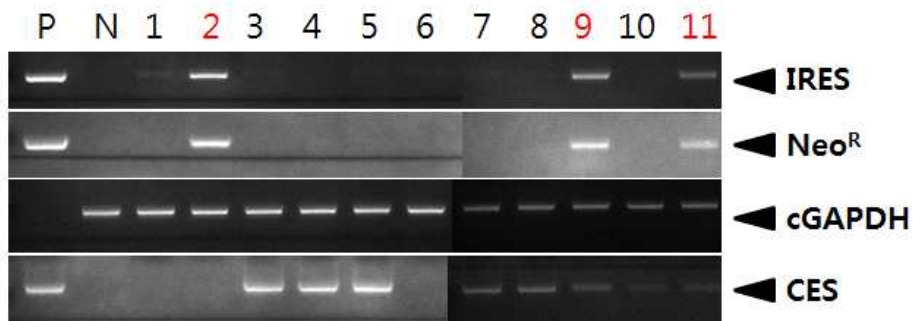


Fig. 75. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the thirteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 11 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

14차 실험군에서는 33마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 수컷 7마리와 암컷 11마리로 모두 18마리이다(Fig. 76). 형질전환율은 약 54.5%로 비교적 높게 나타났다.

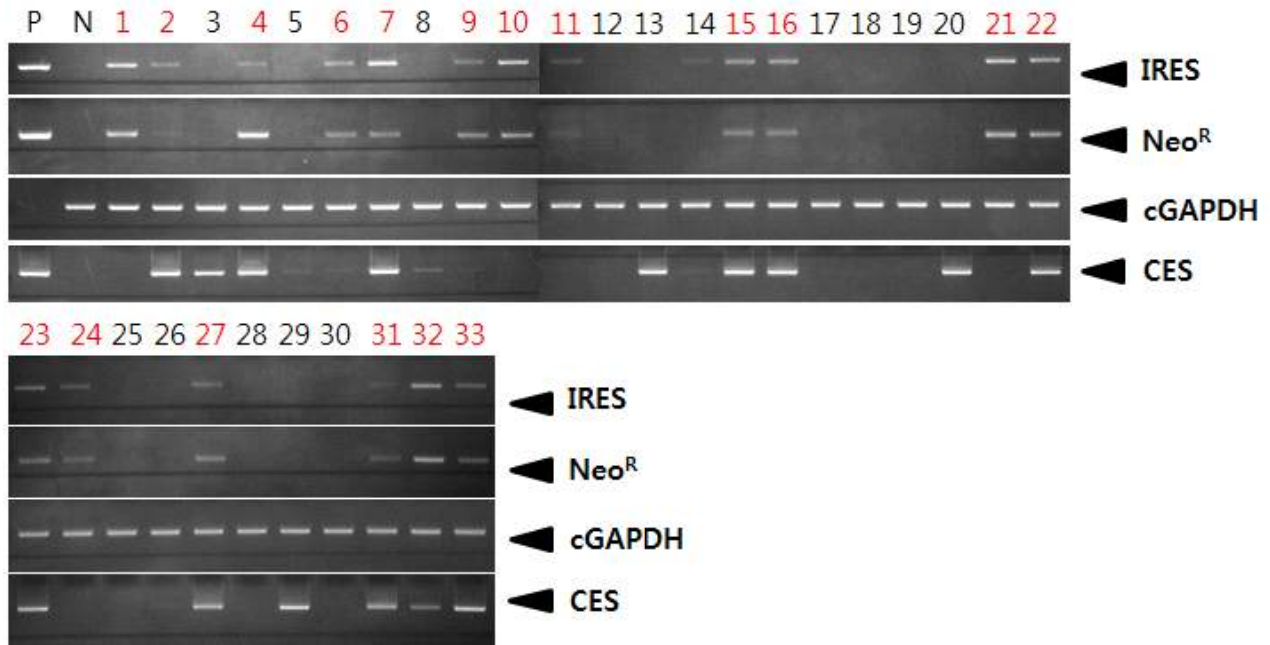


Fig. 76. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the fourteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 33 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

15차 실험군에서는 모두 13마리의 병아리가 부화하였으며, 그 중 3마리가 형질전환 개체로 나타났다(Fig. 77).

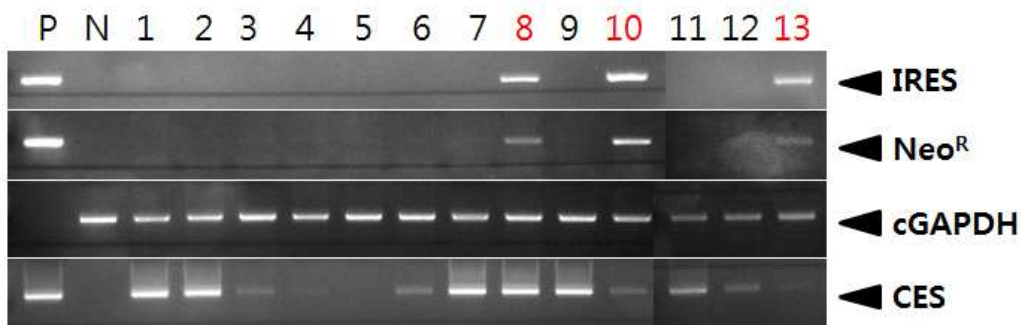


Fig. 77. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the fifteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 13 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

16차 실험군에서는 10마리의 부화한 병아리 중 3마리가 형질전환 개체로 확인되어 30%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 78).

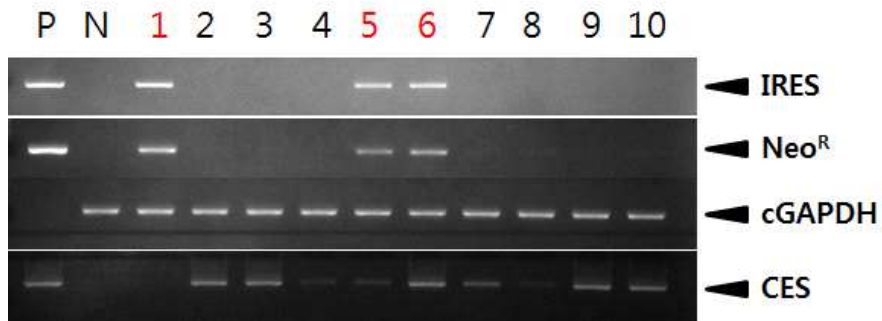


Fig. 78. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the sixteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 10 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

17차 실험군에서의 형질전환 개체는 2 마리가 확인되었으며 모두 수컷으로 나타났다(Fig. 79). 그러나 얼마 지나지 않아 원인불명의 폐사가 발생하였다.

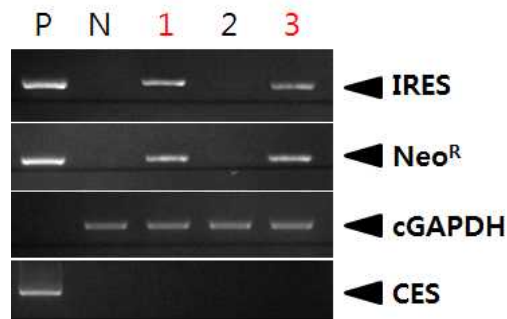


Fig. 79. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the seventeenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

18차 실험군에서는 부화한 10마리 중에 4마리가 형질전환 개체로 확인되었으며 이 중 2마리는 수컷, 2마리는 암컷으로 판명되었다(Fig. 80). 현재 수컷 1마리와 암컷 2마리가 생존하고 있으며 성숙이 진행된 후 암컷은 wildtype의 수컷과 교미하여 G1을 생산하고 수컷은 일차적으로 정자에서 유전자의 전이 여부를 확인하여 생식세포에 유전자가 전이된 개체를 재선별한 후 wild type의 암컷과 교미하여 G1 생산을 시도할 예정이다.

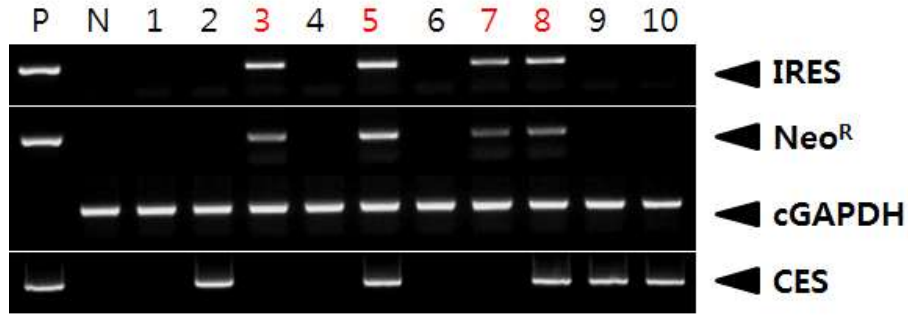


Fig. 80. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens in the eighteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 10 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(다) 형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인 및 G1 세대의 생산

① G0 형질전환 닭의 생식세포에서 cIGF-1 shRNA의 전이 여부 확인

G0 형질전환 개체들의 확인 방법은 혈액에서 분리한 genomic DNA에 대한 PCR 결과를 토대로 하였다. 그러나 G0 개체들은 대부분 mosaic 현상이 심하여 혈액에서 외래 유전자의 전이가 확인되지 않더라도 정자나 다른 장기에서 유전자의 전이가 확인되는 경우도 존재한다. 따라서 유전자의 전이가 확인되지 않더라도 부화한 병아리 중 수컷 개체는 성숙이 완료된 후, 정자를 채취하여 성세포로의 외래 유전자의 전이 여부를 확인하고자 하였다. 그 결과, 혈액의 DNA를 주형으로 하여 PCR을 한 실험 결과에서는 음성으로 확인되었던 TetRNAi-cIGF1i-PTINW virus를 주입한 9차 실험군의 26번 수컷 개체의 정자에서 외래 유전자의 전이가 확인되었으며 이 개체는 wild type의 암컷과 교미하여 G1 형질전환 개체를 생산하고자 하였다. G1 개체의 전이된 외래 유전자의 도입 양상을 보다 정확히 분석하기 위하여 virus vector의 여러 부위에 대한 primer를 제작하여 genomic DNA PCR을 추가적으로 실시하였다. Sperm의 genomic DNA PCR 실험과 본 개체로부터 생산한 G1에서의 genomic DNA PCR 실험에 사용한 primer의 서열은 표 19와 같다.

Table 19. Primers used for genomic DNA PCR analyses of G0 sperm DNA and G1 genomic DNA in TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
psi 747	5'-GTTTGATGTTATGCGCCTGC-3' (+) 5'-GCTGGATAAAGGGAGGATCG-3' (-)	747	55
psi 239	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
psi 363	5'-CCGTCTGAATTTTTGCTTTCGG-3' (+) 5'-GTAGGGGACCTGGTCTGGGTG-3' (-)	363	57
psi 381	5'-CTGAGGAAGGGAGTCGATGTGG-3' (+) 5'-AGGTCTCGGTTAAAGGTGCCGT-3' (-)	381	59
PGKp 243	5'-GTCGTGCAGGACGTGACAAATG-3' (+) 5'-TTTTGAAGCGTGCAGAATGCC-3' (-)	243	57
PGKp 246	5'-CTCGCACACATTCCACATCCAC-3' (+) 5'-AAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTA-3' (-)	246	57
tTS 339	5'-GCCATTTTACGTTGGGTGCAGTAT-3' (+) 5'-TCACCTCACGGTACAGGCTTCTCT-3' (-)	339	57
tTS 374	5'-GGTCGAGGAGGCTCTTTTCATTCT-3' (+) 5'-TCACCTCACGGTACAGGCTTCTCT-3' (-)	374	57
tTS 319	5'-AGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCG-3' (+) 5'-CATAGACAGCGTAGTTGCGCCTC-3' (-)	319	57
tTS 285	5'-AGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCG-3' (+) 5'-TATGCAATCGGGCTCCATCACG-3' (-)	285	57
IRES 275	5'-CCTAGGGGTCTTTCCCCTCT-3' (+) 5'-AGCCCCTTGTTGAATACGCT-3' (-)	275	57
Neo 494	5'-GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGG-3' (+) 5'-GCGATACCGTAAAGCACGAGGAA-3' (-)	494	59
Neo 217	5'-ATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG-3' (+) 5'-ATATCACGGGTAGCCAACGCTATG-3' (-)	217	57
WPRE 315	5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' (+) 5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)	315	60
WPRE 288	5'-GCACTGTGTTTGCTGACGCAAC-3' (+) 5'-AAGGAAGGTCCGCTGGATTGAG-3' (-)	288	60
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

실험 결과는 매우 의외의 결과를 나타내었는데 vector 상의 여러 서열 중 일부 서열에 대한 PCR 증폭 단편이 나타나지 않은 경우가 확인되었다. 이러한 양상은 닭의 genome 상으로 도입된 vector의 일부가 deletion된 형태로 전이되었을 가능성을 나타내는 것으로 판단되었다. 본 sperm의 genomic DNA PCR 결과에 따르면, psi 부분과 tTS 서열, 그리고 PGK promoter 서열에서 증폭이 일어나지 않았다(Fig. 81). 따라서 vector 서열 중에 해당 부분의 전체나 일부가 소실되고 나머지 부분만 genomic DNA 상으로 도입된 것으로 추정되었다.

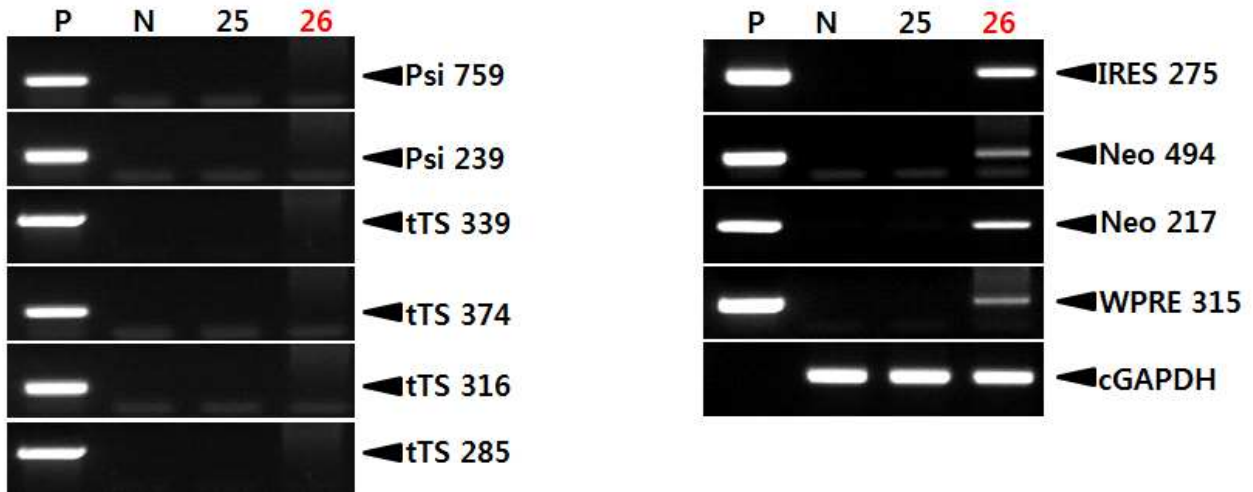


Fig. 81. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

② G1 세대 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

정자에서 외래 유전자의 전이가 확인된 개체는 wild type의 암컷과 교미하여 G1 개체를 생산하였으며, 생산한 45마리의 병아리에서 혈액을 채취하여 DNA를 분리한 후 genomic DNA PCR을 실시한 결과 17번 개체 한 마리에서 외래 유전자의 전이가 확인되었다(Fig. 82).

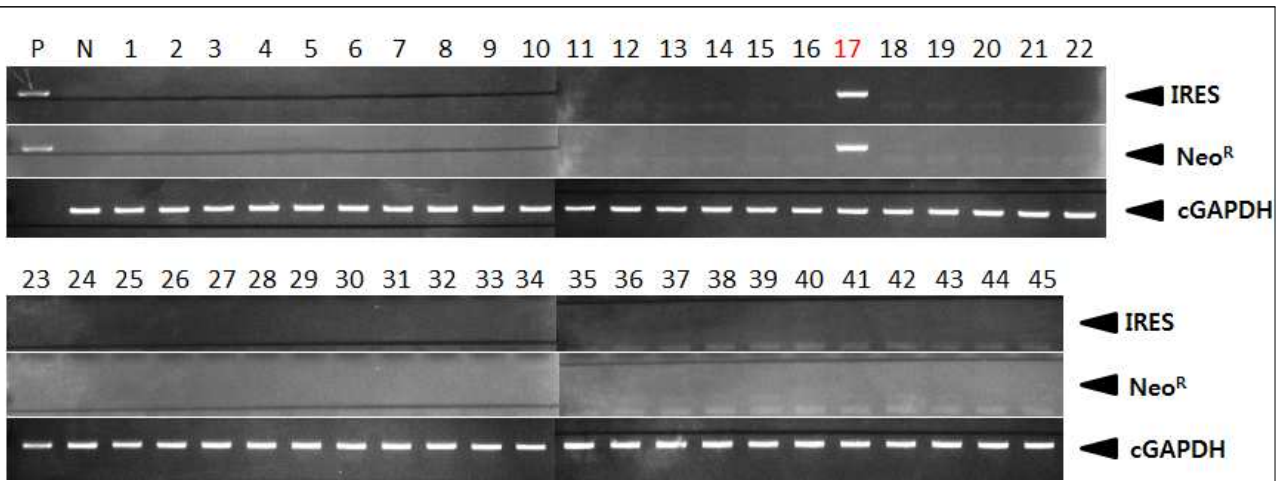


Fig. 82. PCR analyses of G1 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 45 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

추가적인 PCR 실험을 실시하기 전에 G0 개체에 대한 G1 세대의 생산을 진행하였으므로 생산된 G1 개체에 대한 genomic DNA PCR 실험에 있어서도 vector 상의 여러 부위에 대해서 정밀하게 분석할 필요성을 가지게 되었다. 보다 정확한 분석을 위하여 virus vector의 여러 부분에 대한 primer로 PCR을 재실시한 결과 G0 세대의 sperm PCR과 마찬가지로 vector 일부의 서열이 deletion된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 83).

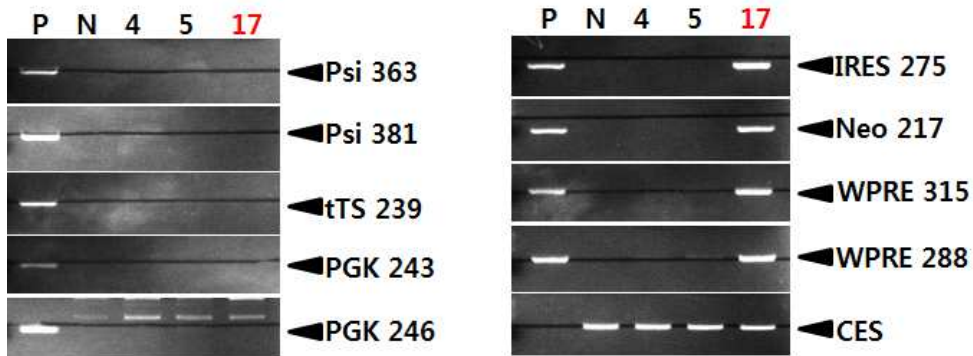


Fig. 83. PCR analyses of G1 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTINW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

③ G1 세대 형질전환 닭의 도입된 외래 유전자의 copy 수 및 결실 여부 확인
Genomic DNA PCR 결과에서 형질전환 개체로 확인된 G1 TetRNAi-cIGF1i-PTINW 형질전

환 닭을 대상으로 genome 내로 도입된 외래 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. 먼저 대조구로 사용할 형질전환되지 않은 닭과 G1 TetRNAi-cIGF1i-PTINW 형질전환 닭 개체의 혈액으로부터 G-Dex II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 각 개체에서 채취한 genomic DNA 15µg을 EcoR I 과 Cla I 의 제한효소로 각각 처리한 후 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하였다. Agarose gel을 통하여 분리된 genomic DNA를 positively-charged nylon membrane (Roche, Germany)에 transfer한 후, Neo와 WPRE probe를 이용하여 hybridization 과정을 거치고, DIG luminescent detection kit (Roche, Germany)을 이용하여 X-ray film에 현상하여 결과를 확인하였다. 각 probe는 PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, Germany)을 이용하여 제작하였으며, probe의 합성에 사용한 primer는 neomycin 저항성 유전자에 대한 5' ATGGGGGTGCACGAATGTCC3' upstream primer와 5' TCATCTGTCCCCTGTCCTGCA3' downstream primer, WPRE 서열에 대한 5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' upstream primer와 5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' downstream primer를 이용하였다. Genomic DNA 상에 삽입된 provirus 내의 PGK promoter 서열 내에 위치한 EcoR I 부위와 WPRE 서열의 3' 위치에 있는 Cla I 부위를 제한 효소로 절단하여 각 probe를 사용하여 확인한 결과, positive control인 plasmid DNA에서는 단일 band가 확인된 데 비하여 제한효소를 처리한 G1 개체의 genomic DNA에서는 여러 개의 band가 나타났다(Fig. 84). 이러한 양상은 genomic DNA PCR 결과에서 예상했던 PGK promoter 부위의 결실로 인해 EcoR I 부위가 제거됨으로써 해당 부위의 제한효소 처리에 의한 절단이 이루어 지지 않아서 나타나는 것으로 추정되었다. Negative 대조구인 정상 닭의 genomic DNA에서는 외래 유전자의 전이가 나타나지 않았다.

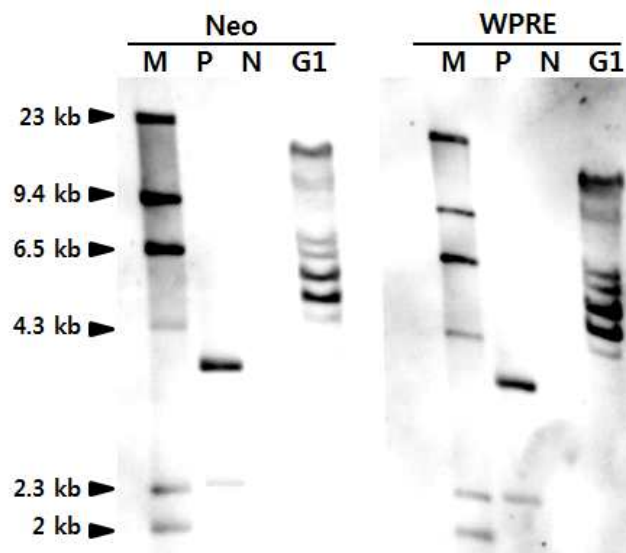


Fig. 84. Southern blot analysis of G1 TetRNAi-cIGF1i-PTINW transgenic chicken. Genomic DNA of chickens was digested with EcoR I and Cla I and hybridized with the Neomycin resistance gene probe (Neo) or WPRE probe (WPRE). Lane M, molecular size markers; lane P, pTetRNAi-cIGF1i-PTINW plasmid DNA; lane N, non-transgenic control chick; lanes G1, transgenic G1 chicken sired by a transgenic G0 rooster.

(2) pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 이용한 고농도의 virus 생산은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. Virus 생산 세포인 GP2 293 세포에 pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector를 transfection한 후 G418 (600 µg/ml)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 vector가 전이된 세포주를 확보하였다. 확보한 GP2 293-LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW 세포에 pVSV-G를 transient transfection하여 48시간 후 virus를 수확한 후 TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 이용한 실험과 동일한 방법으로 고농도로 농축하였다. 이 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세 주입하여 대리난각 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였으며 neomycin 저항성 유전자와 tTS 서열에 대한 primer를 이용하였다. LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭의 실험은 6차에 걸쳐서 진행하였으며 모두 676개의 유정란을 사용하였다. 이 가운데 약 15.7%인 106개의 유정란이 부화하였으며 genomic DNA PCR 분석을 통해 확인한 결과, 20마리가 형질전환된 개체로 나타났다(Table 20). 10마리 중 수컷과 암컷이 각각 10마리이며 수컷 개체는 성성숙이 완료되는 대로 정자에서 외래 유전자의 전이 여부를 확인하고자 하였다.

Table 20. Hatchability of LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	166	7 (4.2)	1 (14.3)
2	144	11 (7.6)	6 (54.5)
3	125	11 (8.8)	6 (54.5)
4	136	4 (2.9)	4 (100)
5	105	10 (9.5)	3 (30)
6	208	63 (30.3)	6 (9.5)
Total	676	106 (15.7)	26 (24.5)

1차 실험군에서는 7마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 1마리뿐이었으며 부화 후 얼마 지나지 않아서 폐사하였다(Fig. 85).

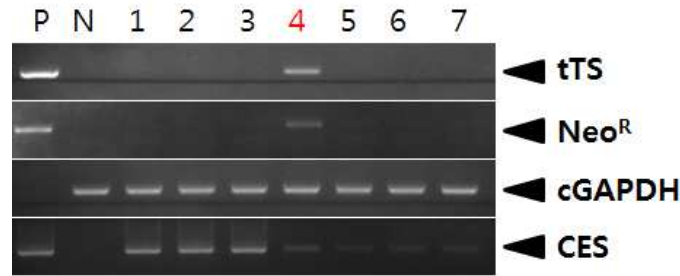


Fig. 85. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서는 부화한 11마리 중에 6마리가 형질전환 개체로 확인되었으며 이 중 3마리는 수컷, 3마리는 암컷으로 판명되었다(Fig. 86).

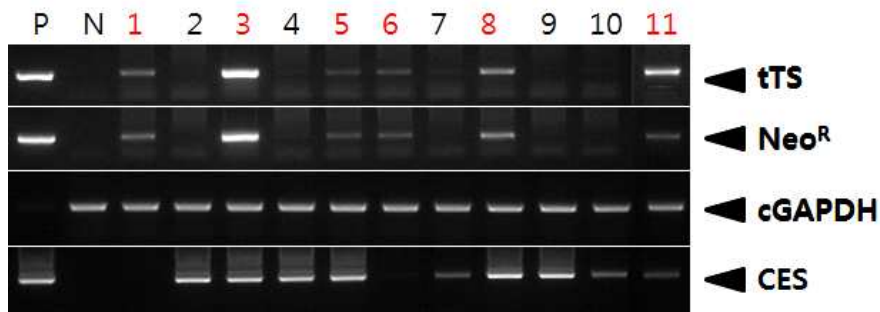


Fig. 86. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 11 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

125개의 수정란에 virus를 미세주입한 3차 실험군에서는 11마리의 병아리가 부화하였고, 그 중 6마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 87).

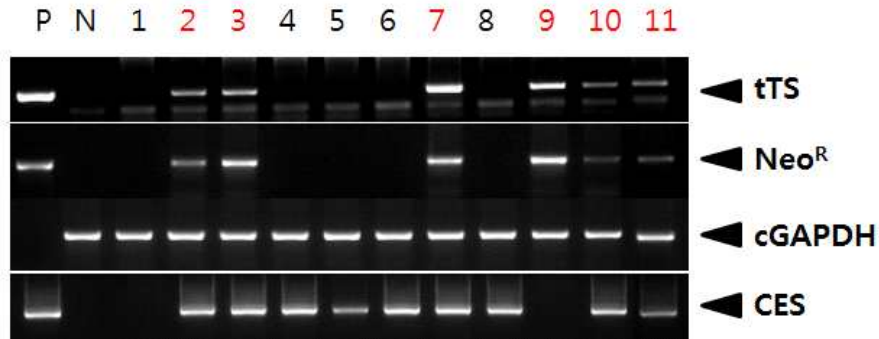


Fig. 87. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 11 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 부화한 4마리의 병아리가 모두 형질전환 개체로 확인되었으며 전부 수컷으로 나타났다(Fig. 88). 이 중 3마리가 생존해 있으며 성성숙이 완료되는 대로 wild type의 암컷과 교미하여 G1을 생산하고자 하였다.

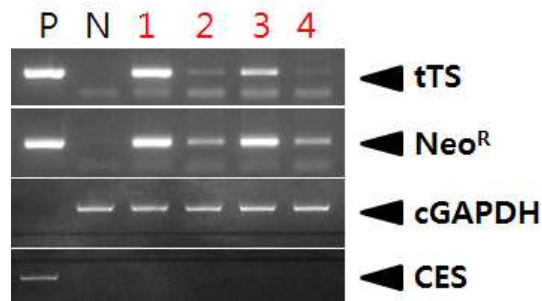


Fig. 88. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 4 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTNW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

5차 실험군에서는 10마리의 부화한 병아리 중 3마리가 형질전환 개체로 확인되어 30%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 89). 현재 암컷 1마리와 수컷 1마리가 생존해 있다.

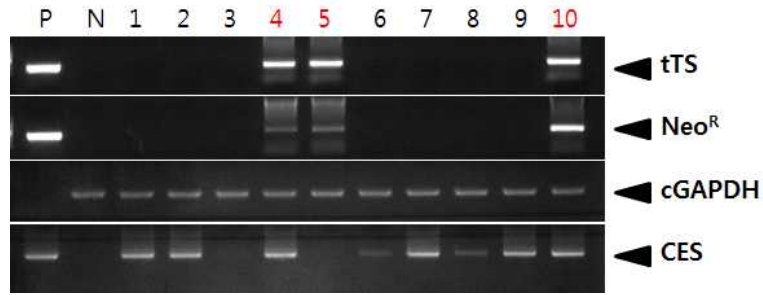


Fig. 89. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fifth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 10 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 미세주입하여 형질전환 닭을 생산하기 위한 6차 실험군에서는 208개의 virus를 주입한 유정란 중에서 63개가 부화하여 약 30.3%의 부화율을 나타내었으며, 부화한 병아리 중 6마리가 형질전환된 것으로 확인되어 9.5%의 비교적 낮은 형질전환율을 보였다(Table 3, Fig. 90). 이 중 2마리가 수컷이고 4마리가 암컷인 것으로 확인되었으며 현재 수컷 2마리와 암컷 1마리가 생존해 있다.

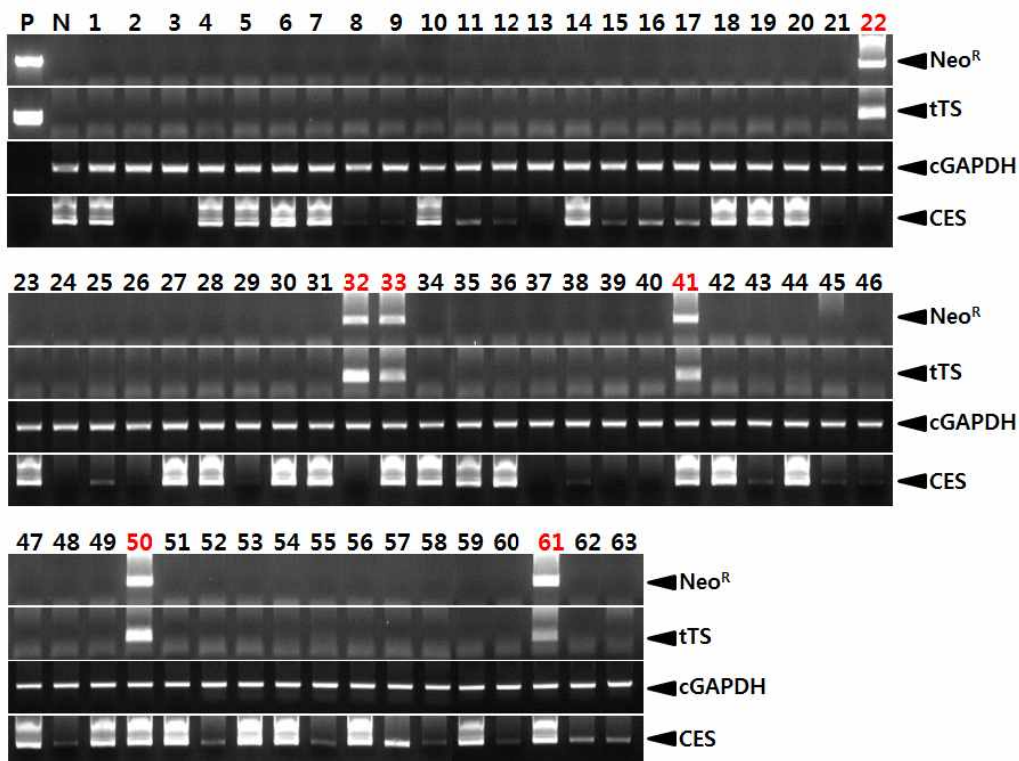


Fig. 90. PCR analyses of G0 LN-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the sixth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 63 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLN-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(3) pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

전 단계에서 구축한 vector인 pTetRNAi-cIGF1i-PTW를 이용하여 계란의 배반엽층에 미세주입하기 위한 고농도의 virus를 생산하고자 하였다. 먼저 GP2 293-pTetRNAi-cIGF1i-PTW 세포주에 pVSV-G를 transient transfection하여 virus를 수확하여 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 이 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입한 후 대리난각 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. Virus를 주입한 유정란은 37.7°C의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30° 각도로 전란시키면서 15일간 배양하였다. 19일째부터는 계란을 37°C의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양시켰다. 배양하는 동안 10일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부를 관찰하였으며 각 실험군의 부화율과 형질전환율을 조사하였다.

(나) G0 세대의 cIGF-1 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

부화한 병아리의 cIGF1 shRNA의 전이를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 부화한 지 1개월된 병아리에서 채취한 혈액으로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 psi와 rtTA, Hygromycin 저항성 유전자에 대한 PCR을 실시하였으며 대조구로 cGAPDH 유전자에 대한 PCR도 실시하였다. 또한 개체의 암수 구별을 위해서 CES 유전자에 특이적인 primer로 PCR 반응을 실시하였다. 각 primer는 표 21과 같으며 각 reaction mixture를 94°C에서 30초(denaturation), 57°C 또는 60°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초(extension)로 반응하는 과정을 35회 실시하였고 72°C에서 7분간 방치하여 완전한 extension을 유도하였다.

Table 21. Primers used for genomic DNA PCR of TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
psi	5'-CTTTCAGAGGCAATACTGGCGAAG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	239	57
rtTA	5'-GACGACAAGGAACTCGCTCAA-3' (+) 5'-TTGTCTCAGAAGTGGGGGCATA-3' (-)	442	60
Hygro ^R	5'-GCTCTCGATGAGCTGATGCTTTG-3' (+) 5'-AGAATGAAAAGAGCCTCCTCGACC-3' (-)	208	57
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60
CES	5'-CCCAAATATAACACGCTTCAC-3' (+) 5'-GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC-3' (-)	315	60

TetRNAi-cIGF1i-PTW virus vector가 도입된 형질전환 닭 생산 실험은 17차에 걸쳐서 진행하였는데, virus를 미세주입한 2,537개의 유정란 중에서 부화한 병아리는 모두 422마리로 16.6%의 부화율을 나타내었으며 이 중 260마리가 형질전환된 G0 개체인 것으로 확인되어 약 61.6%의 형질전환율을 나타내었다(Table 22). 외래 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체 중 수컷은 116마리, 암컷은 144마리로 확인되었다. 간혹 형질전환 개체 중에 혈액에서는 외래 유전자의 전이가 확인되지 않으나 성세포에서는 전이가 확인되는 경우가 있을 가능성을 염두에 두어 genomic DNA PCR에서 증폭이 확인되지 않은 수컷 개체도 정자에서 외래 유전자의 전이 여부를 확인하기 위하여 확보해 두었다.

Table 22. Hatchability of TetRNAi-cIGF1i-PTW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)	♀/♂
1	142	8 (5.6)	8 (100)	4/4
2	151	22 (14.6)	6 (27.3)	2/4
3	112	6 (5.4)	2 (33.3)	1/1
4	119	54 (45.4)	46 (85.2)	25/21
5	107	18 (16.8)	11 (61.1)	11/0
6	160	33 (20.6)	30 (90.9)	16/14
7	94	5 (5.3)	5 (100)	4/1
8	87	10 (11.5)	3 (30)	2/1
9	27	13 (48.1)	7 (53.8)	6/1
10	135	56 (41.5)	49 (87.5)	20/29
11	189	34 (18.3)	10 (29.4)	5/5
12	240	14 (5.8)	7 (50.0)	4/3
13	217	64 (29.5)	32 (50.8)	21/11
14	163	8 (4.9)	8 (100)	5/3
15	173	25 (14.5)	15 (60.0)	8/7
16	205	20 (9.8)	9 (45.0)	3/6
17	216	32 (14.8)	12 (37.5)	7/5
Total	2,537	422 (16.6)	260 (61.6)	144/116

첫 번째 실험군에서는 8마리의 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과 모든 개체가 형질전환된 것으로 확인되어 형질전환율은 100%로 나타났으며, 암컷과 수컷이 각각 4마리인 것으로 확인되었다(Fig. 91).

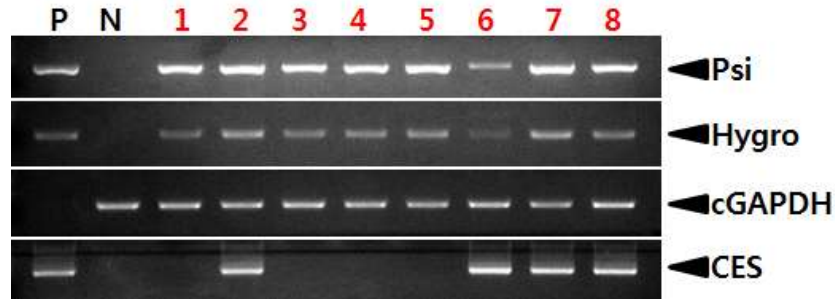


Fig. 91. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 8 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서는 22마리가 부화하였으며 이 중 6마리가 형질전환 개체로 확인되어서 약 27.3%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 92). 이 중 4마리가 수컷이고 2마리가 암컷으로 확인되었으며 현재는 암컷 2마리만 생존하고 있다.

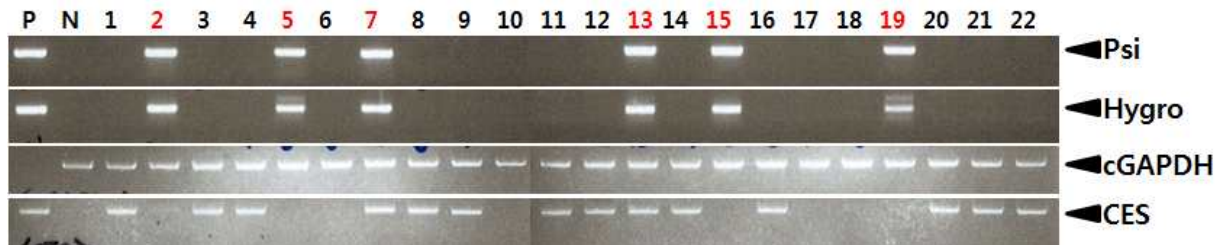


Fig. 92. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 22 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에서 부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR을 실시한 결과, 부화한 6마리 중 2마리가 형질전환 개체로 확인되었으며 암컷과 수컷 각각 한 마리인 것으로 판명되었으며 현재 암컷만 생존해 있다(Fig. 93).

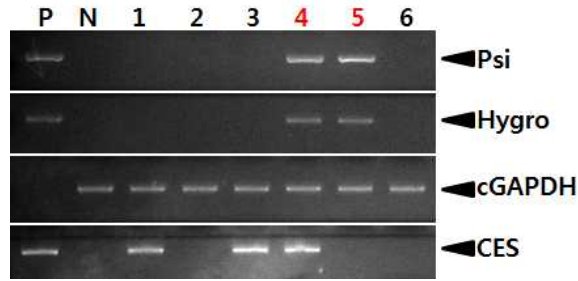


Fig. 93. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 6 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 119개의 virus를 주입한 유정란 중에서 54개가 부화하여 약 45.4%의 부화율을 나타내었다. 부화한 병아리 중 46마리가 형질전환된 것으로 확인되어 85.2%의 높은 형질전환율을 보였다(Fig. 94). 이 중 21마리가 수컷이고 25마리가 암컷인 것으로 확인되었다.

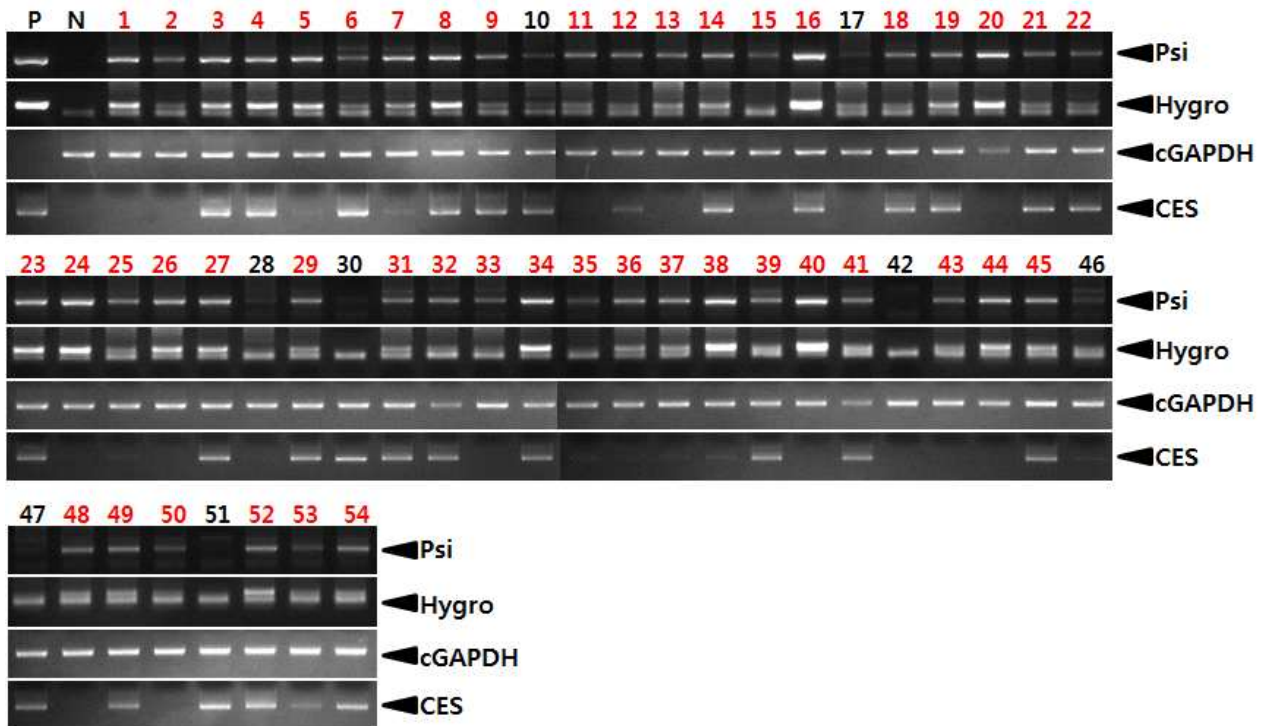


Fig. 94. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 54 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

5차 실험군에서는 18마리가 부화하였으며, 이 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 11마리이며 모두 암컷으로 판명되었다(Fig. 95).

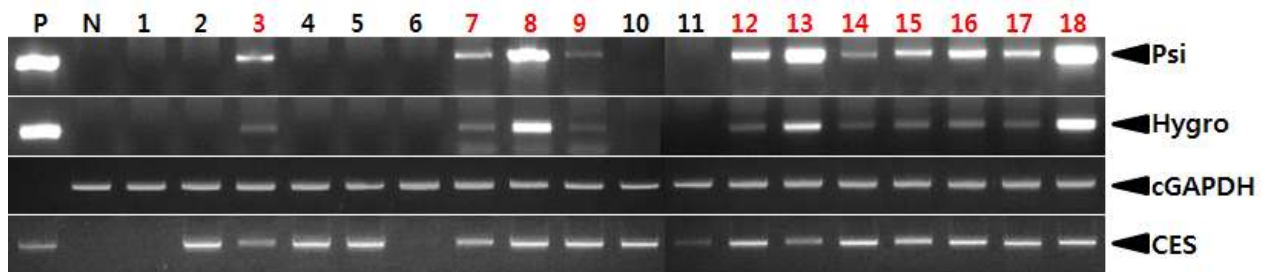


Fig. 95. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fifth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 18 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

6차 실험군에서는 160개의 유정란에 virus를 미세주입하여 33마리의 병아리가 부화하여 약 20.6%의 부화율을 보였으며, 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체 30마리 중 수컷은 14마리, 암컷은 16마리로 확인되었다(Fig. 96). 현재 수컷과 암컷이 각각 13마리, 15마리가 생존해 있다.

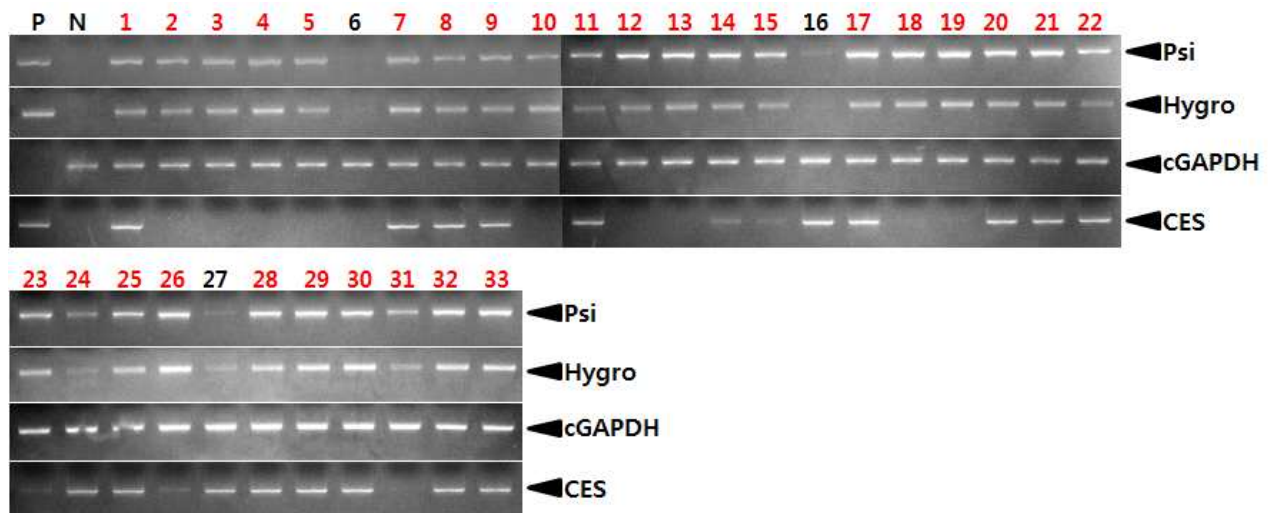


Fig. 96. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the sixth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 33 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

7차 실험군에서는 부화율이 5.3%로 매우 저조하였으나 부화한 5마리의 개체가 모두 형질전환된 개체로 확인되었다(Fig. 97). 수컷과 암컷이 각각 1마리와 4마리로 현재 생존해 있다.

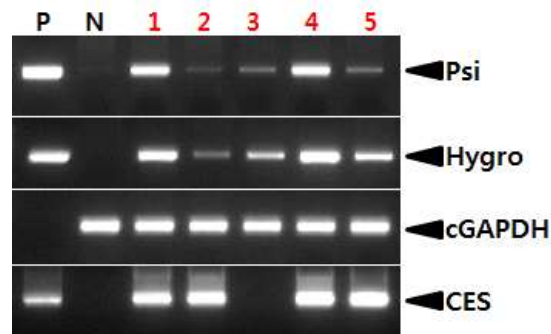


Fig. 97. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the seventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 5 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

8차 실험군에서는 87개의 virus를 주입한 유정란 중 10개가 부화하였으며, 부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과 3마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 98). 암컷과 수컷 각각 2마리, 한 마리인 것으로 판명되었다.

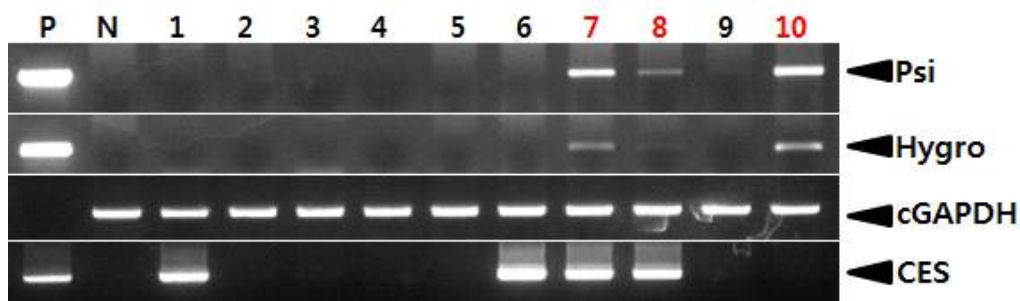


Fig. 98. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the eighth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 10 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

9차 실험군에서는 13마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 7마리이며, 수컷은 1마리이고 암컷은 6마리로 확인되었다(Fig. 99).

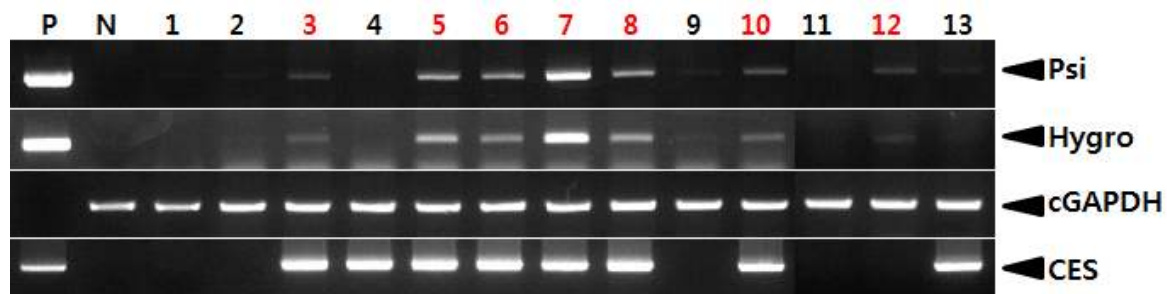


Fig. 99. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the ninth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 13 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

10차 실험군에서는 135개의 virus를 주입한 유정란 중에서 56개가 부화하여 약 41.5%의 부화율을 나타내었으며, 부화한 병아리 중 49마리가 형질전환된 것으로 확인되어 87.5%의 높은 형질전환율을 보였다(Fig. 100). 이 중 29마리가 수컷이고 20마리가 암컷인 것으로 확인되었다.

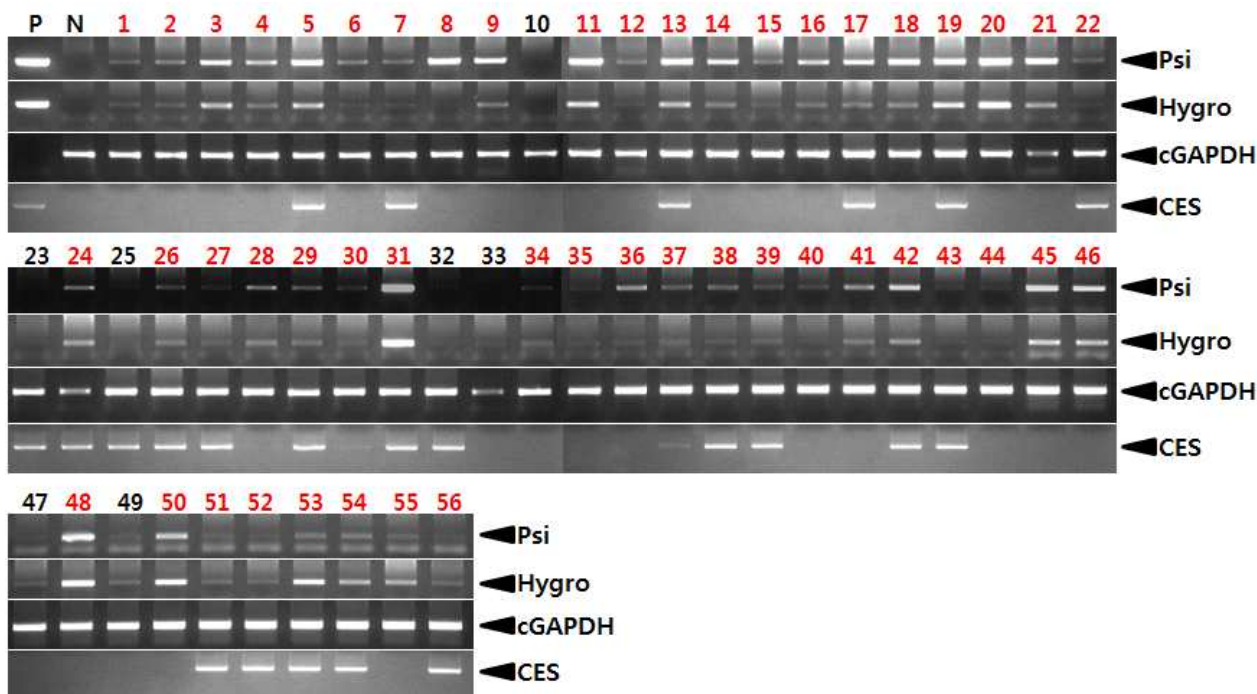


Fig. 100. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the tenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 56 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

11차 실험군에서는 189개의 유정란에 virus를 미세주입하여 34마리가 부화하였다. 부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과 10마리가 형질 전환된 개체로 확인되었으며, 암컷과 수컷이 각각 5마리인 것으로 나타났다(Fig. 101).

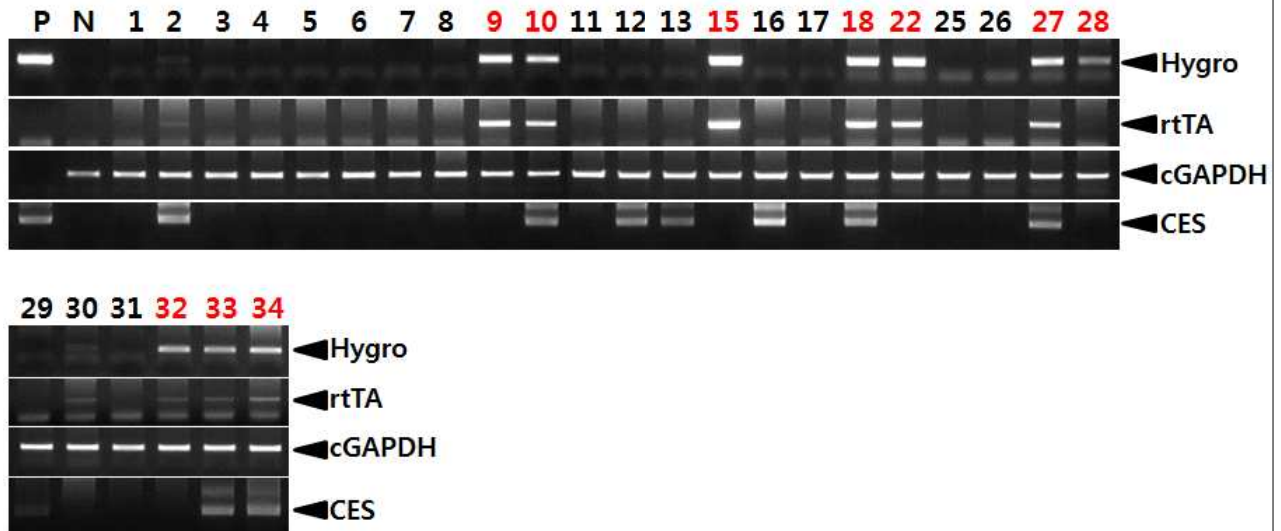


Fig. 101. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the eleventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 34 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

12차 실험군에서는 14마리가 부화하였으며 이 중 7마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 102). 이 중 3마리가 수컷이고 4마리가 암컷으로 확인되었으며 현재는 수컷 한 마리만 생존하고 있다.

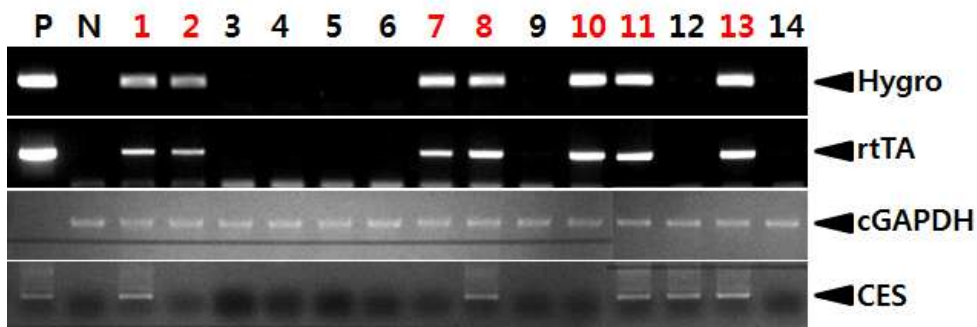


Fig. 102. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the twelfth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 14 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

13차 실험군에서는 217개의 virus를 주입한 유정란 중에 64개가 부화하여 29.5%의 부화율을 보였으며, 부화한 병아리 중 32마리가 형질전환된 것으로 나타나서 약 50.8%의 형질전환율을 나타내었다. 암컷과 수컷이 각각 21마리와 11마리인 것으로 확인되었으며 수컷은 성성숙이 완료되는 대로 수컷은 정자에서의 유전자 전이 여부를 확인하고 G1 세대의 형질전환 닭 생산에 투입될 예정이다(Fig. 103).

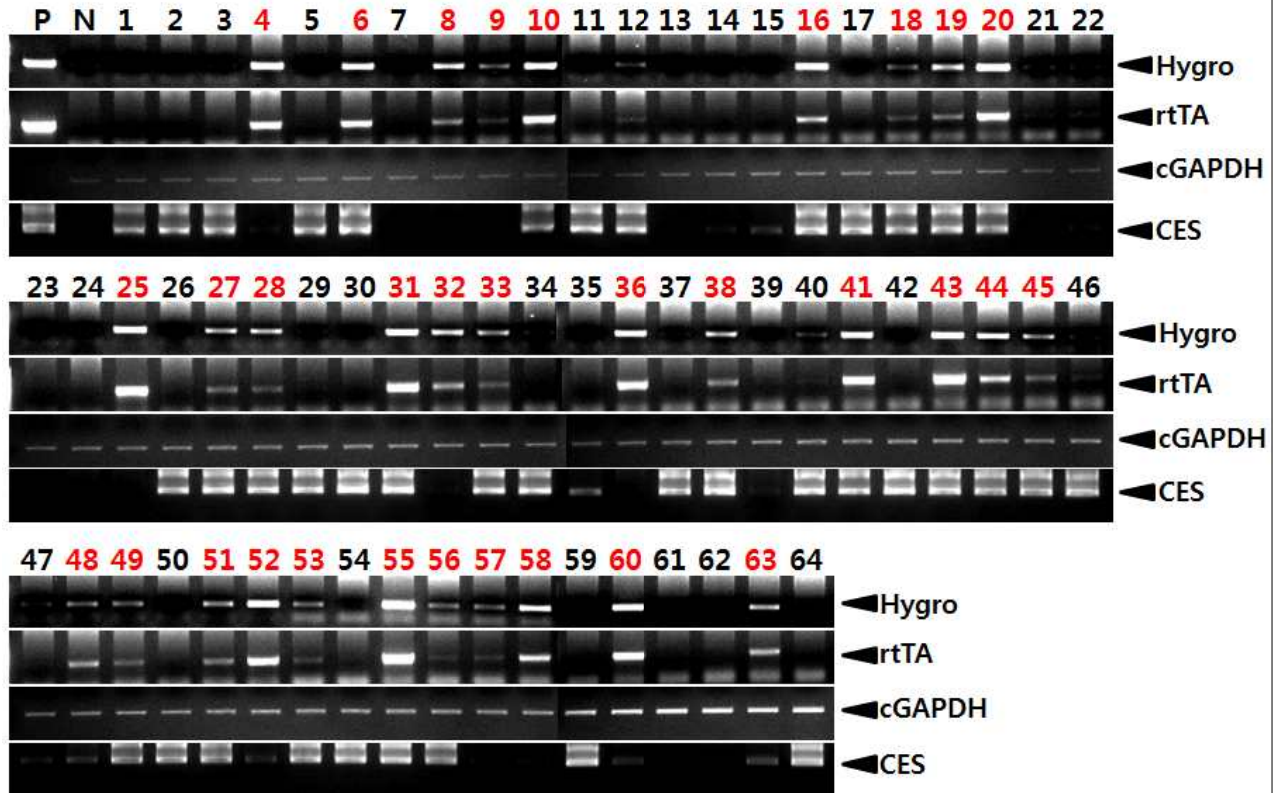


Fig. 103. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the thirteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 64 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

14차 실험군에서는 163개의 virus를 주입한 유정란 중에서 8개만 부화하여 약 4.9%의 매우 낮은 부화율을 나타내었다. 그러나 부화한 병아리 모든 개체에서 외래 유전자의 전이가 확인되어 100%의 높은 형질전환율을 보였다(Fig. 104). 현재 생존해 있는 개체는 형질전환이 확인된 수컷 3마리이다.

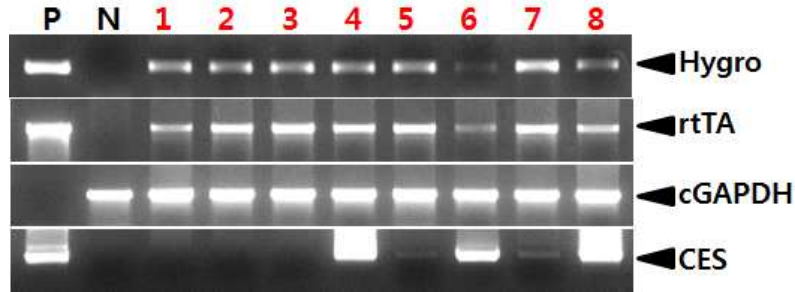


Fig. 104. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fourteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 8 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

15차 실험군에서는 25마리가 부화하였으며, 이 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 15마리이며 수컷은 7마리인 것으로 판명되었다(Fig. 105). 현재 생존해 있는 개체 수는 외래 유전자 전이가 확인된 4마리와 전이가 확인되지 않은 2마리로 모두 6마리이다.

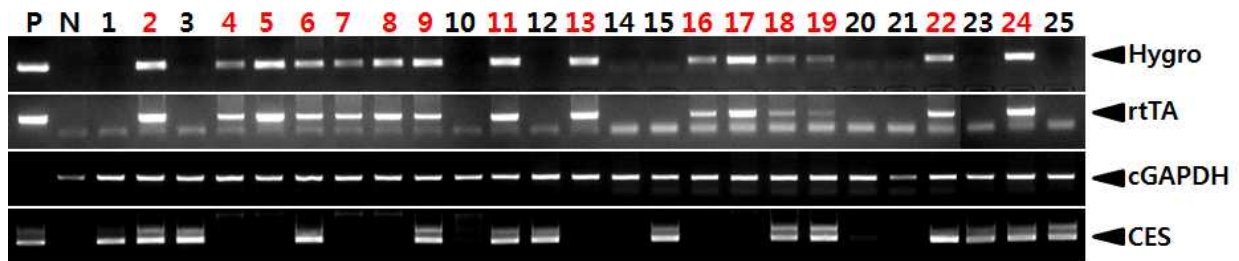


Fig. 105. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fifteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 25 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

16차 실험군에서는 205개의 유정란에 virus를 미세주입하여 20마리의 병아리가 부화하여 약 9.8%의 부화율을 보였으며, 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체 9마리 중 수컷은 6마리, 암컷은 3마리로 확인되었다(Fig. 106).

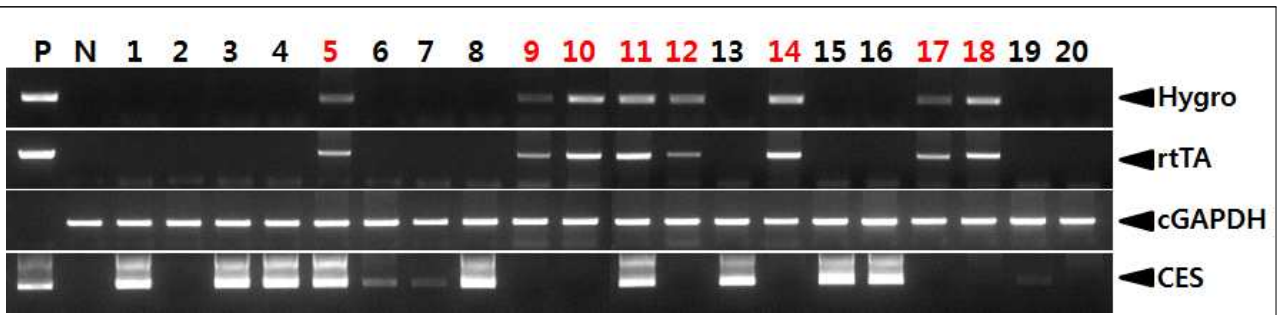


Fig. 106. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the sixteenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 20 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

17차 실험군에서는 32마리가 부화하였으며 이 중 12마리가 형질전환된 개체로 확인되어 37.5%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 107). 수컷과 암컷이 각각 5마리와 7마리인 것으로 확인되었으며, 현재 수컷 4마리와 유전자 전이가 확인되지 않은 수컷 12마리가 생존해 있다.

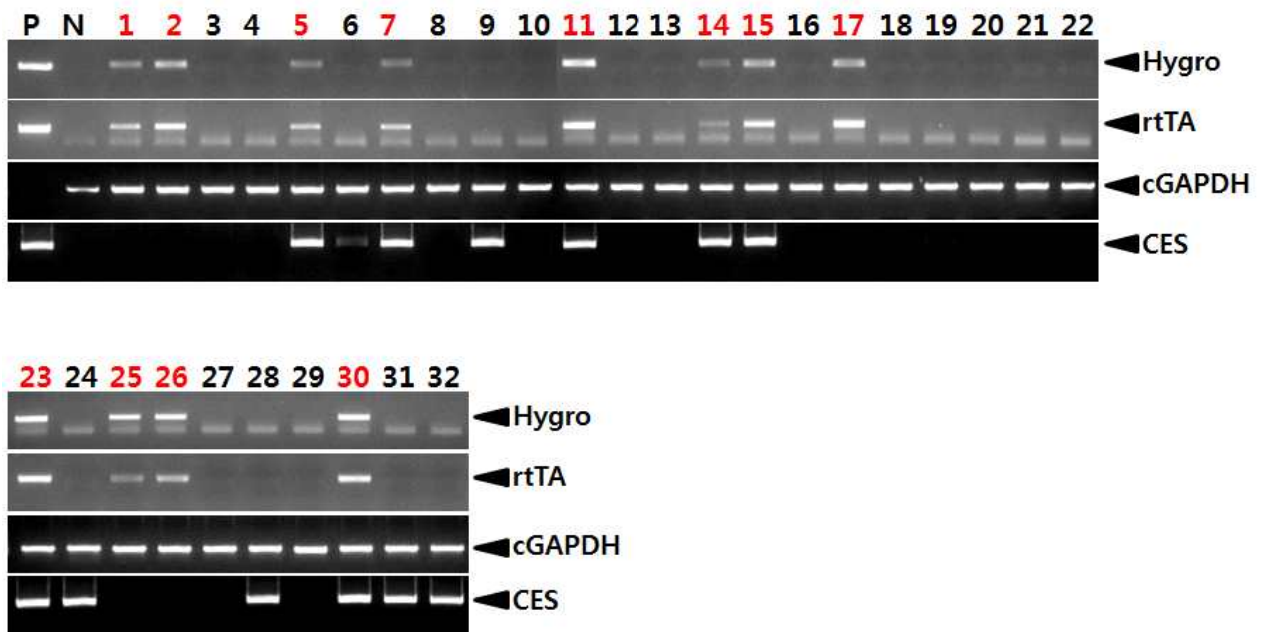


Fig. 107. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the seventeenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 32 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(3) 형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인 및 G1 세대 형질전환 닭의 생산

- ① G0 형질전환 닭의 생식세포에서 cIGF-1 shRNA의 전이 여부 확인

G0 개체 중에서 성성숙이 완료된 수컷의 정자를 채취하여 genomic DNA PCR을 실시하였다. 이 실험에서는 혈액으로부터 분리한 genomic DNA에서 PCR을 실시한 결과에서 증폭 단편이 확인되지 않은 수컷에서도 정자를 채취하여 PCR을 실시하였다. 이는 G0 개체들이 대부분 mosaic 양상을 나타내어 혈액에서는 외래 유전자가 전이되지 않더라도 정자나 다른 장기에서 그 전이가 확인되는 경우가 종종 나타나기 때문이다. 이에 정자에서의 외래 유전자 전이 여부 확인은 형질전환 여부와 관계없이 성성숙이 완료된 모든 수컷을 대상으로 진행하였다. TetRNAi-cIGF1i-PTW 실험군 중 4차 실험군에서 부화한 형질전환 수컷 두 마리의 정자에서 genomic DNA PCR을 실시한 결과, 한 마리에서만 외래 유전자의 전이가 확인되었으며 개체 번호는 618번이다(Fig. 108).

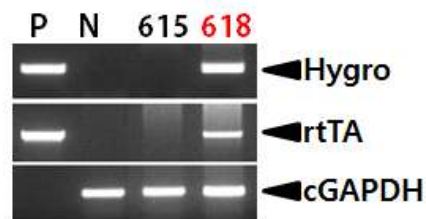


Fig. 108. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

TetRNAi-cIGF1i-PTW 실험군 중 6차 실험군 수컷에서의 정자의 DNA PCR에서는 9마리 중 4마리에서 외래 유전자의 전이가 확인되었으며(Fig. 109), 상태가 양호하지 않은 686번을 제외한 나머지 개체는 wild type의 암컷과 교미하여 G1 개체 생산을 시도하였다.

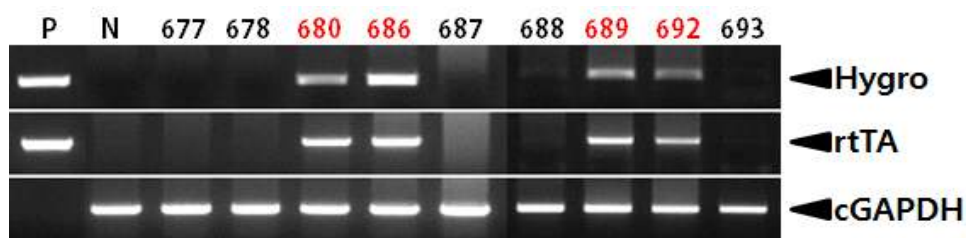


Fig. 109. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

TetRNAi-cIGF1i-PTW 8차 실험군의 성숙이 완료된 수컷을 대상으로 정자 DNA PCR을 실시한 결과, 두 마리 중 한 마리에서 증폭 단편이 확인되었다(Fig. 110). 이 개체도 전자와 마찬가지로 wild type의 암컷과 교미하여 G1 개체 생산을 시도하고자 하였다.

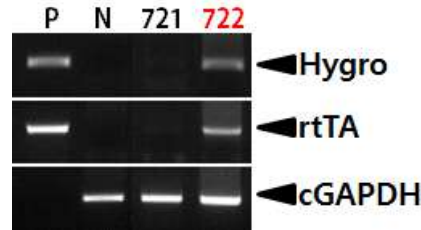


Fig. 110. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

TetRNAi-cIGF1i-PTW 10차 실험군은 성숙이 완료된 수컷 개체가 가장 많은 실험군으로 13마리에서 sperm DNA PCR을 실시하였다. 그 중 4 마리에서 외래 유전자의 전이가 확인되었으며 각 개체를 wild type의 암컷과 교미시켜서 G1 개체를 생산하였다(Fig. 111). 4 마리의 개체 번호는 737, 746, 750, 756번이다.

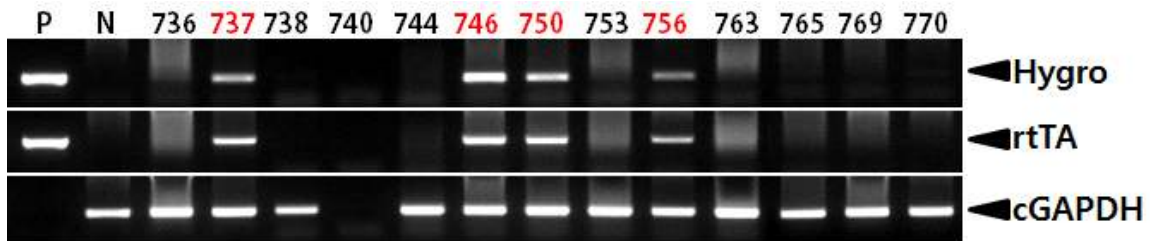


Fig. 111. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

생산한 TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭 중에 12차 실험군의 수탉 한 마리도 hygromycin 저항성 유전자와 rtTA 서열에 대한 PCR 증폭 단편이 확인되었다(Fig. 112). 이 개체는 832번 개체로 wild type의 암컷과 교미시켜서 G1 개체 생산을 시도하였다.

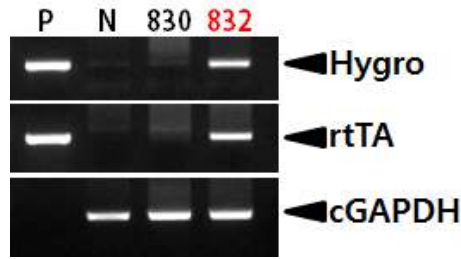


Fig. 112. PCR analyses of sperm DNA in G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

② G1 세대 형질전환 닭 혈액에서의 genomic DNA PCR 분석

Sperm에서 genomic DNA PCR을 실시하여 외래 유전자의 전이가 확인된 개체(Chicken No. 618, 680, 689, 692, 722, 737, 746, 750, 756, 832)는 wild type의 암컷과 교미시켜서 G1 형질 전환 개체를 생산하고자 하였다. 각 수컷 group의 암컷이 산란한 유정란을 부화기에서 21일간 배양한 후 각 group의 부화율과 형질전환율을 검정하고자 하였다. 각 group들은 다양한 부화율을 나타내었으며 현재까지 G1 형질전환 개체가 생산된 group은 737, 750, 756번 수컷과 교미시킨 group으로 각각 1마리, 1마리, 3마리의 G1 개체가 확인되었다(Table 23).

Table 23. Hatchability and transgenic efficiency of G1 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chicks derived from transgenic roosters

Rooster No.	Number of fertilized eggs	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)	G1 chicken No.
618	132	90 (68)		
680	109	77 (71)		
689	355	71 (20)		
692	235	108 (46)		
722	171	87 (51)		
737	132	96 (73)	1 (1)	737-008
746	146	101 (69)		
750	128	32 (25)	1 (3)	750-010
756	229	188 (82)	3 (1.6)	756-011, 756-028, 756-084
832	92	68 (74)		

각 group에서 산란한 개체는 부화한 일주일 경과 후에 날개 안쪽 정맥에서 혈액을 채취하여 genomic DNA를 분리하였으며 분리한 DNA를 주형으로 하여 PCR을 실시하여 외래 유전자의 전이 여부를 확인하고자 하였다. 현재까지 생산된 TetRNAi-cIGF1i-PTW G1 개체를 대상으로 형질전환 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 실시하였으며, 그 결과 모든 개체에서 외래 유전자의 전이가 확인되었다(Fig. 113).

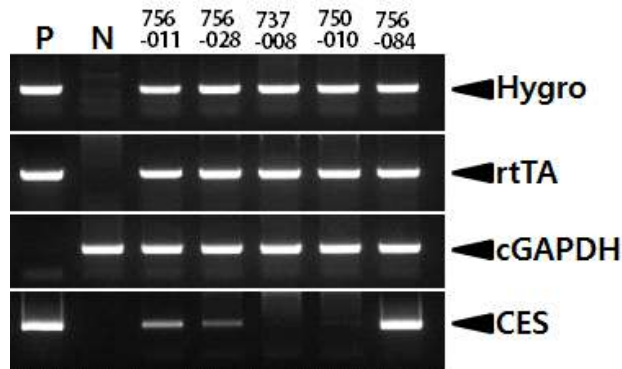


Fig. 113. PCR analyses of G1 TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chicks derived from transgenic rooster. Genomic DNA was isolated from the blood of 5 hatched chicks and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

③ G1 세대 형질전환 닭에 도입된 외래 유전자의 copy 수 확인

Genomic DNA PCR 결과에서 형질전환 개체로 확인된 G1 TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭을 대상으로 외래 유전자의 도입 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. 먼저 756번 형질전환 수탉으로부터 생산된 11번 개체(756-011)와 750번 수탉으로부터 생산된 10번 개체(750-010)의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하였다. Plasmid와 유전자가 전이되지 않은 닭의 genomic DNA, 그리고 G1 형질전환 닭의 genomic DNA에 각각 Bgl II 제한효소를 처리한 후 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하였다. Agarose gel을 통하여 분리된 genomic DNA를 positively-charged nylon membrane (Roche, Germany)에 transfer한 후, *Psi^f sequence* gene에 대한 probe를 이용하여 hybridization 과정을 거치고, DIG luminescent detection kit (Roche, Germany)을 이용하여 X-ray film에 현상하여 결과를 확인하였다. 각 probe는 PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, Germany)을 이용하여 제작하였으며, probe의 합성에 사용한 primer는 Psi 서열에 대한 5' GCTGGATAAAGGGAGGATCC 3' upstream primer와 5' GTTTGATGTTATGCGCCTGC 3' downstream primer로 증폭된 단편의 size는 747 bp이다. pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector 상에 한 곳에서만 절단되는 제한효소인 BglII를 처리하여 genomic DNA 상에 도입된 외래 유전자의 copy 수를 확인하고자 한 결과, positive control인 plasmid DNA에서는 단일 band가 확인되었으며 negative 대조구인 정상 닭의 genomic DNA에서는 외래 유전자의 전이가 나타나지 않았고, 제한효소를 처리한 G1 개체에서는 한 개의 band가 확인되었다(Fig. 114). 따라서 G1 개체에 1 copy의 외래 유전자가 전달된 것을 알 수 있었다.

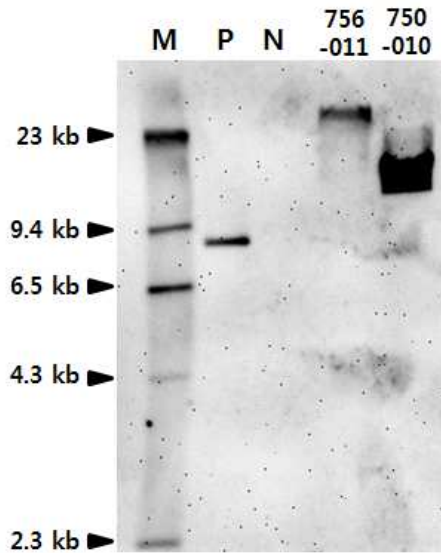


Fig. 114. Southern blot analysis of G1 transgenic chickens. Genomic DNA of chickens was digested with Bgl II and hybridized with the *Psi⁺* sequence gene probe. Lane M, molecular size markers; lane P, pTetRNAi-cIGF1i-PTW plasmid DNA; lane N, non-transgenic control chicken; lanes 756-011 and 750-010, G1 transgenic chickens sired by G0 transgenic roosters No. 756 and 750.

④ G1 TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭에서의 cIGF-1 shRNA가 도입된 Tet system을 이용한 *cIGF-1* 유전자 발현의 knock-down 효율 검증

본 연구에서 생산한 TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭에서 cIGF-1 shRNA에 의한 *cIGF-1* 유전자 발현의 knock-down 효율을 단백질 수준에서 검정하고자 하였다. 이에 2주령의 외래 유전자가 전이되지 않은 닭과 756-011 형질전환 닭의 식이에 1 mg/g 농도의 doxycycline을 첨가하여 2주간 공급하였으며 식이 직전과 식이 7일 경과 후, 그리고 2주 후에 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장에서의 cIGF-1 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다. ELISA 실험은 CUSABIO (China)사의 제품인 chicken IGF-1 ELISA kit을 사용하였으며 실험 과정은 *in vitro* 실험에서와 동일하게 진행하였다. 실험 결과, 정상 닭에서의 cIGF-1의 농도는 26.3 ng/ml, 32.0 ng/ml, 45.5 ng/ml의 농도로 지속적인 증가 양상을 보인데 반해 형질전환 개체에서는 식이 전 28.8 ng/ml 농도에서 7일 후 25.2 ng/ml, 그리고 2주 후 20.4 ng/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 115). 이는 cIGF-1 shRNA가 개체 내에서 *cIGF-1* 유전자 발현을 knock-down하고 있음을 보여주는 결과이다. 그러나 한 개체만을 대상으로 하여 실험을 진행하였으므로 결과의 개연성을 높이기 위해 다른 G1 개체를 대상으로 한 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

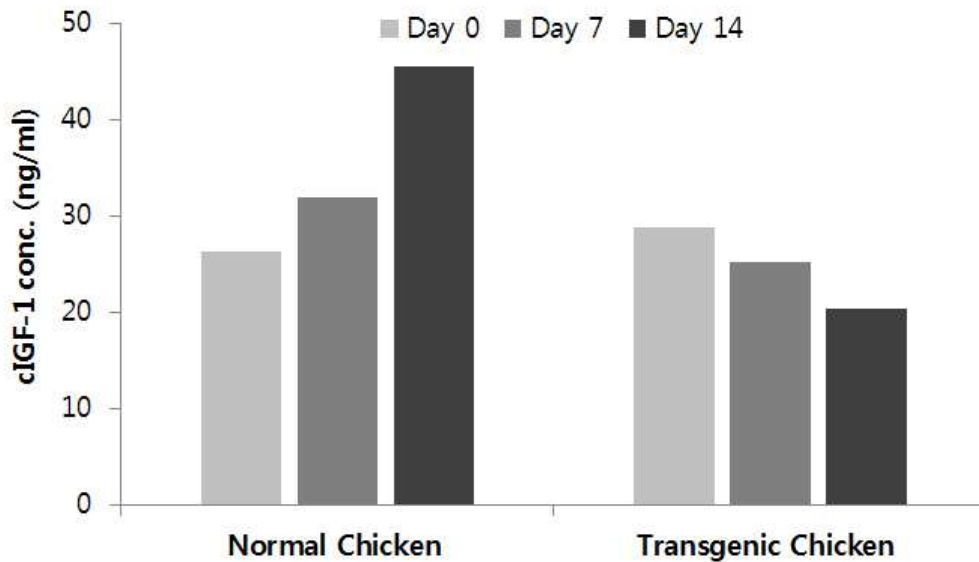


Fig. 115. ELISA analyses of the *cIGF-1* gene expression in G1 transgenic chicken fed with doxycycline. Normal Chicken indicates non-transgenic chicken, and Transgenic Chicken indicates TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chicken fed with doxycycline for 0, 7 and 14 days, respectively.

(4) pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

고농도의 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus 생산 과정은 다음과 같다. 먼저 293FT 세포에 구축한 pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW expression vector와 packaging plasmid mix와 함께 calcium/phosphate 방법으로 co-transfection을 실시하였다. Packaging plasmid mix로는 System Biosciences (USA)의 pFIV-34N과 pVSV-G plasmid를 사용하였다. Transfection하고 8시간 경과 후 새 배지로 교환하였으며, 48시간 후 virus를 수확한 후 LN-TetRNAi-cGHirGHpTW virus를 이용한 실험과 동일한 방법으로 고농도로 농축하였다. 이 virus stock을 stage X의 계란 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다.

(나) G0 세대의 shRNA 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭의 생산 과정은 전 실험인 LN-TetRNAi-ccIGF1i-rGHpTW 형질전환 닭의 생산과 동일한 과정으로 진행하였으며 미세주입한 virus의 종류만 달리하였다. 부화한 병아리의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 primer 서열은 다음과 같다(Table 24). FTR 1 primer는 vector 서열 중 RRE-cPPT-TRE-cIGF-1i-PGK promoter 부분을 증폭하며, FTR 2 primer는 TRE-cIGF-1i-PGK promoter-tTs 서열 일부분, 그리고 FTR 3는 tTS-WPRE 서열 부분을 증폭하는 데 사용하고자 하였다.

Table 24. Primers used for genomic DNA PCR of CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
FTR 1	5'-ACTGTGCTGAGTTCTTCCCTTTGA-3' (+) 5'-GTGCTACTTCCATTGTGCACGTCC-3' (-)	972	58
FTR 2	5'-ATAGAGAACGTATGTCTGAGGTAGGCG-3' (+) 5'-TGGACCAGTAATGCTTTACGGAAACT3' (-)	993	56
FTR 3	5'-AATCGAAGGTTTAACAACCCGTA-3' (+) 5'-GCATTAAAGCAGCGTATCCACATAG-3' (-)	905	56
cGAPDH	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+) 5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)	275	60

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 계란의 배반엽 층에 미세주입하여 형질전환 닭을 생산하는 실험은 모두 12차에 걸쳐 실시되었으며 현재까지 70마리의 형질전환 닭을 생산하였다 (Table 25). 이 개체 중 수컷은 성숙이 완료된 후 각 개체의 정자에서 genomic DNA PCR 결과 외래 유전자의 전이가 확인되면 G1 생산을 위한 wild type의 암컷과 교미를 진행하였다.

Table 25. Hatchability of CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus injected silky embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	186	17 (9.1)	7 (41.2)
2	186	6 (3.2)	5 (83.3)
3	186	26 (14.0)	1 (3.8)
4	270	92 (34.1)	31 (33.7)
5	185	24 (13.0)	8 (33.3)
6	211	12 (5.7)	9 (75.0)
7	176	12 (6.8)	5 (41.7)
8	185	28 (15.1)	5 (17.9)
9	181	64 (35.4)	2 (3.1)
10	185	8 (4.3)	2 (25.0)
11	194	29 (14.9)	14 (48.3)
12	190	18 (9.5)	12 (66.7)
Total	2,145	327 (15.2)	70 (21.4)

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 미세주입하여 형질전환 닭을 생산하기 위한 1차 실험군에서는 186개의 virus를 주입한 유정란 중에서 17개가 부화하여 약 9.1%의 부화율을 나타내었으며, 부화한 병아리 중 7마리가 형질전환된 것으로 확인되어 41.2%의 형질전환율을 보였다(Table 3, Fig. 116).

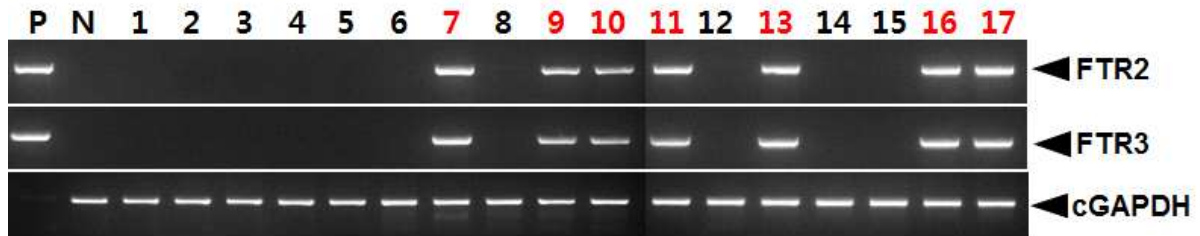


Fig. 116. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 17 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW 2차 실험군에서도 186개의 유정란에 virus를 주입하였으며 부화한 6마리 중에 한 마리만을 제외한 5마리가 형질전환된 개체인 것으로 나타났다(Fig. 117).

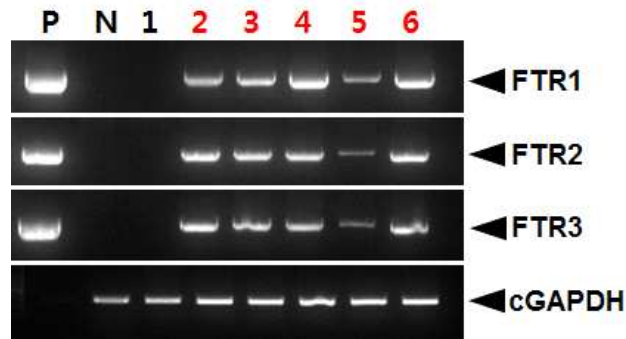


Fig. 117. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 6 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에서 virus를 주입한 186개의 유정란 중에서 26마리가 부화하였으며 genomic DNA PCR 결과 형질전환된 개체로 확인된 것은 한 마리뿐이었다(Fig. 118).

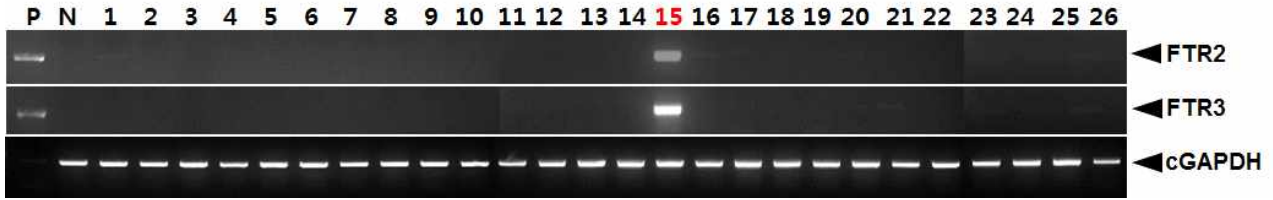


Fig. 118. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 26 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 270개의 유정란 중 34.1%에 해당하는 92개의 유정란이 부화하였으며 이 중 31마리의 개체가 형질전환된 것으로 확인되었다(Fig. 119). 나머지 61마리의 부화한 병아리 중에서 genomic DNA PCR 반응에 있어서 사용한 두 primer 중 한 종류의 primer 반응에서만 증폭이 일어나는 경우가 관찰되었으며 PCR을 반복적으로 실시하여도 동일한 현상이 나타났다. 이는 전이된 vector의 일부분에서 유전자의 손실이 발생한 데서 원인을 찾을 수 있을 것으로 추정되었다.

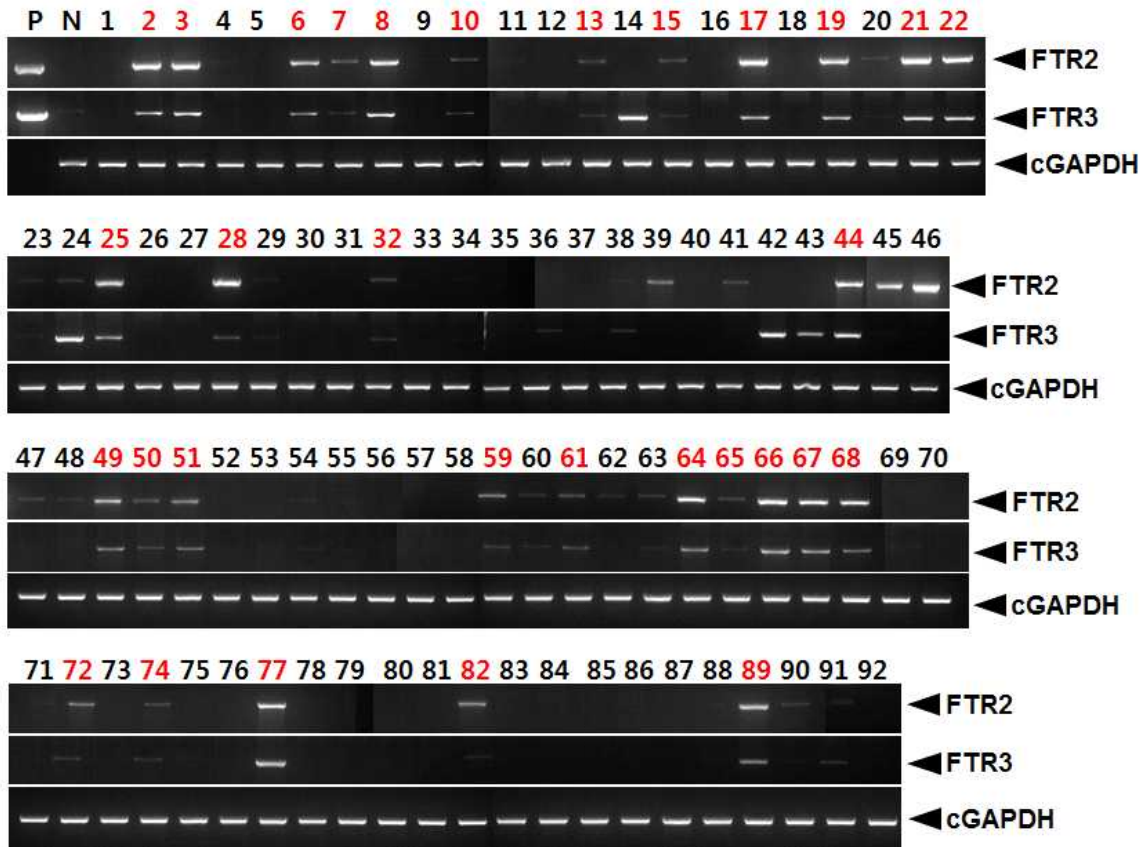


Fig. 119. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 92 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid

DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW 5차 실험군에서는 185개의 유정란에 virus를 주입하였으며 부화한 24마리 중에 8마리가 형질전환된 개체인 것으로 나타났으며 형질전환율은 33.3%이다(Fig. 120).

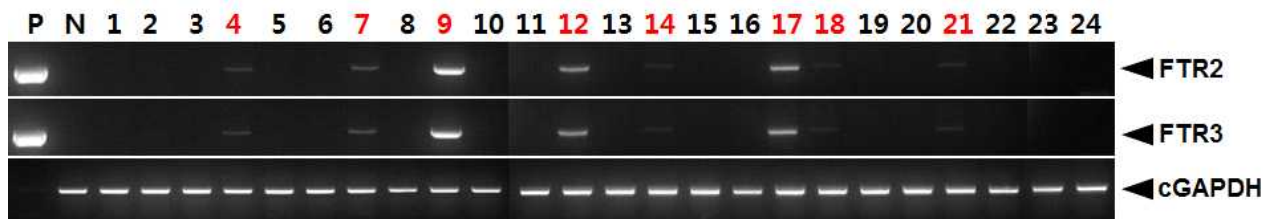


Fig. 120. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the fifth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 24 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

6차 실험군은 211개의 유정란에 virus를 미세주입하여 12마리의 병아리가 부화하였다. 부화한 12마리 중에 9마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되어 형질전환율은 75%인 것으로 나타났다(Fig. 121).

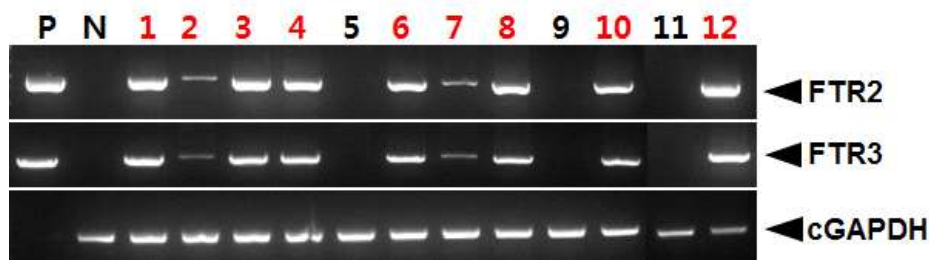


Fig. 121. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the sixth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 12 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

다음 7차 실험군에서는 176개의 유정란에 virus를 미세주입하여 대리난각을 실시하였으며 모두 12마리의 병아리가 부화하여 6.8%의 부화율을 나타내었다. 부화한 병아리를 7일간 사양한 후 채혈하여 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 genomic DNA PCR을 실시한 결과 5마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었으며 형질전환율은 41.7%로 나타났다(Table 4; Fig. 122).

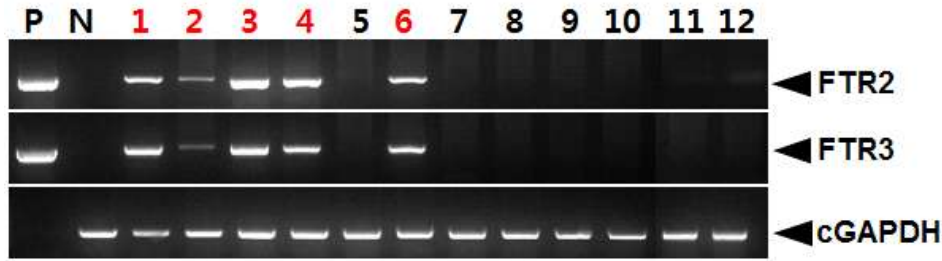


Fig. 122. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the seventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 12 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

8차 실험에서는 28마리의 부화한 병아리 중에서 5마리에서 PCR 증폭 단편이 확인되었다 (Fig. 123). 이 개체들은 성숙이 완료된 후에 G1 세대 생산을 위한 실험을 진행할 예정이다.

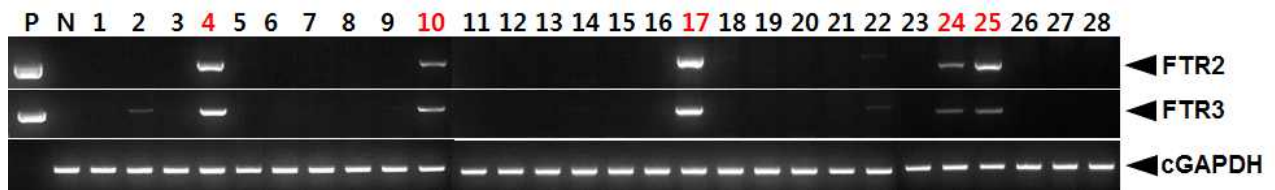


Fig. 123. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the eighth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 28 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

9차 실험군에서는 181개의 유정란에 virus를 미세주입하여 대리난각을 실시하였다. 21일 후 64개의 유정란이 부화하여 약 35.4%의 부화율을 보였으며 이 중 단 2마리만이 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Fig. 124). 높은 부화율에 비해 형질전환율이 낮은 현상은 virus가 배아에 대한 독성을 지니고 있어서 비교적 감염성이 낮은 virus가 주입된 것으로 생각된다.

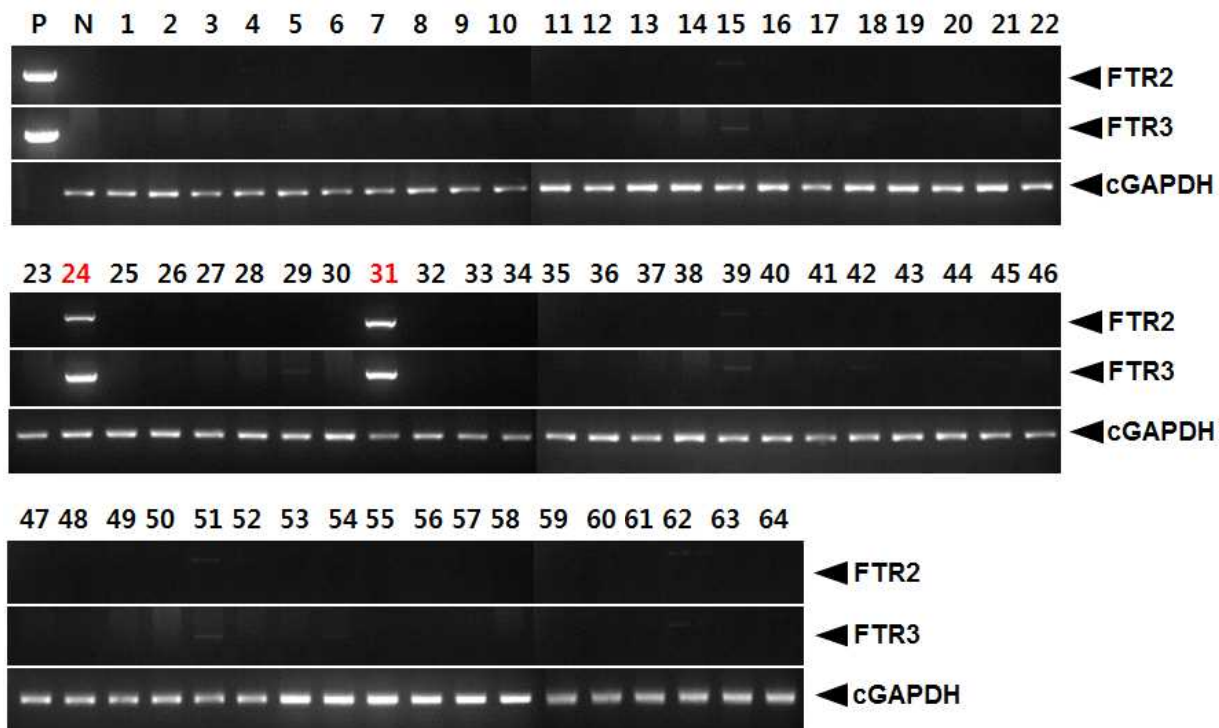


Fig. 124. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the ninth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 64 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

10차 실험군은 185개의 유정란에 virus를 미세주입하여 8마리의 병아리가 부화하였다. 이 중 2마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Fig. 125).

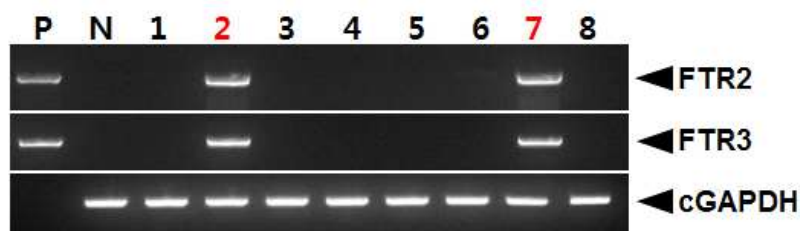


Fig. 125. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the tenth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 8 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

11차 실험에서는 194개의 유정란에 고감염성의 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 미세주입 하였으며 29마리가 부화하였다. 부화율은 14.9%이며 형질전환율은 48.3%로 29마리 중에 14마리가 형질전환 개체인 것으로 나타났다(Fig. 126).

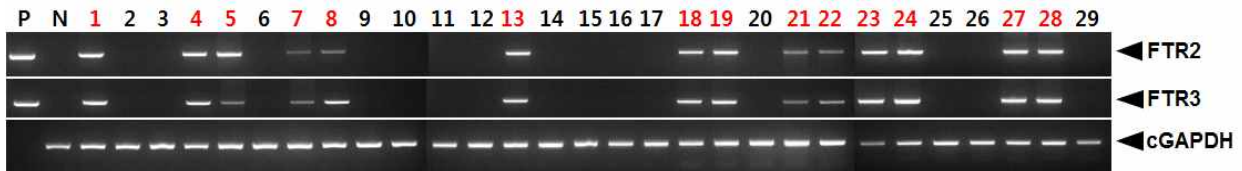


Fig. 126. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the eleventh experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 29 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

마지막 12차 실험에서는 부화한 18마리 중에 12마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었으며 형질전환율은 66.7%로 나타났다(Fig. 127).

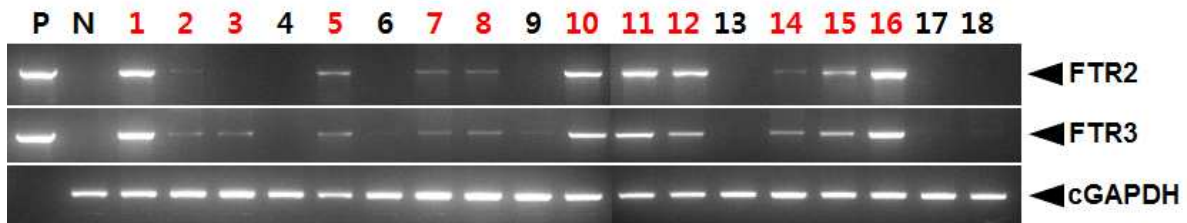


Fig. 127. PCR analyses of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in the twelfth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 18 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(3) 형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인 및 G1 세대 형질전환 닭의 생산

① G0 형질전환 닭의 생식세포에서 cIGF-1 shRNA의 전이 여부 확인

Germline transmission의 가능성을 확인을 위하여 성숙이 완료된 형질전환 수컷 개체에서 채취한 정자의 DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 주입한 실험군 중 3차 실험군의 부화한 개체 중 성숙이 완료된 수컷의 정액을 채취하여 genomic DNA를 분리하였다. 이 genomic DNA를 주형으로 하여 FTR 1, FTR 2, FTR 3 그리고 GAPDH primer로 PCR을 실시한 결과, 3차 실험군 개체 중 2, 3, 7, 16, 18, 22번 개체에서 외래 유전자의 전이가 확인되었다(Fig. 128). 각 개체는 F302, F303, F307, F316, F318, F322로 명명하였다. 이 개체들은 혈액에서 분리한 genomic DNA PCR에서는 유전자의 전이가 확인되지 않은 개체들이다. 각 개체는 wild type의 암컷과 교미하여 G1 세대를 생산하고자 하였다.

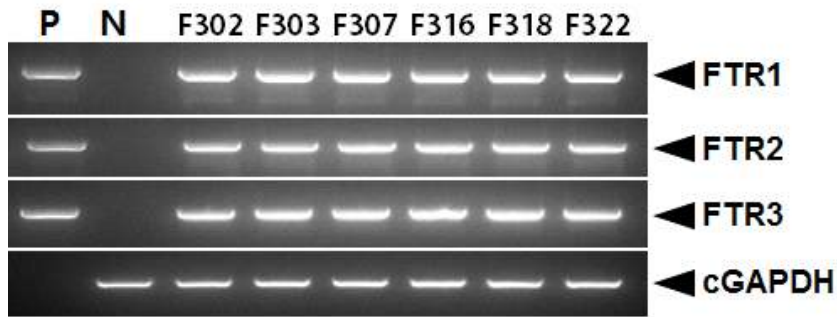


Fig. 128. PCR analyses of sperm DNA of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in third experiment. Genomic DNA was isolated from the sperm of male chickens and was subjected to PCR analyses. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm was used, respectively.

CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 주입한 실험군 중 4차 실험군에서도 성숙이 완료된 수컷에서 정자의 DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과, 4차 실험군 개체 중 3, 7, 16, 26, 57, 65번 개체에서 외래 유전자의 전이가 확인되었다(Fig. 129). 각 개체는 F403, F407, F416, F426, F457, F465로 명명하였다. 이 개체들 중 F403, F407, F465은 혈액에서 분리한 genomic DNA PCR에서 외래 유전자의 전이가 확인된 개체이고 나머지 F416, F426, F457는 유전자의 전이가 확인되지 않은 개체들이다. 3차 실험군과 마찬가지로 각 개체는 wild type의 암컷과 교미하여 G1 세대를 생산하고자 하였다.

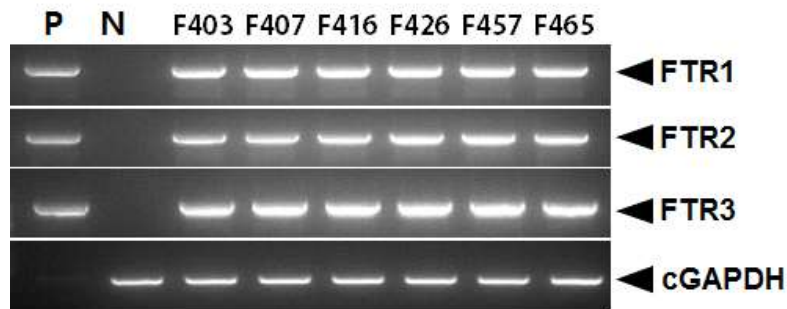


Fig. 129. PCR analyses of sperm DNA of G0 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens in fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the sperm of male chickens and was subjected to PCR analyses. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm was used, respectively.

② G1 세대 형질전환 닭 혈액에서의 genomic DNA PCR 분석

정자에서 genomic DNA PCR을 실시하여 외래 유전자의 전이가 확인된 개체는 wild type의 암컷과 교미시켜서 G1 형질전환 개체를 생산하고자 하였다. CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW 3차 실험군에서 germline transmission이 확인된 개체인 F302, F303, F307, F316, 그리고 F318 수컷

group의 암탉이 산란한 유정란을 부화기에서 21일간 배양하였다. 각 group들은 0.9%에서 3.7%의 다양한 형질전환율을 나타내었으며 각각의 G1 형질전환 개체는 표 26에서와 같이 명명하였다.

Table 26. Germline transmission rates from G0 founder rooster in third experiment

G0 founder rooster No.	* Numer of G1 transgenic chicks/total offspring (%)	G1 transgenic chicken No.
F302	8/215 (3.7%)	F302-01 ~ F302-08
F303	2/222 (0.9%)	F303-01 ~ F303-02
F307	2/396 (0.5%)	F307-01 ~ F307-02
F316	5/233 (2.1%)	F316-01 ~ F316-05
F318	3/332 (0.9%)	F318-01 ~ F318-03

* Transgenic chicks were identified by genomic DNA PCR

3차 실험군인 수탉에서 생산된 G1 개체는 모두 20마리이며, 이 중 13마리는 여러 종류의 primer를 사용한 PCR에서 증폭 단편이 정상적으로 확인되었으나 나머지 7마리는 FTR 1과 FTR 2 primer를 이용한 PCR 반응에서 증폭 단편이 확인되지 않았다(Fig. 130). 이러한 현상의 원인은 G1 개체에 전이된 virus vector의 일부분의 결실에 의한 것으로 추정된다.

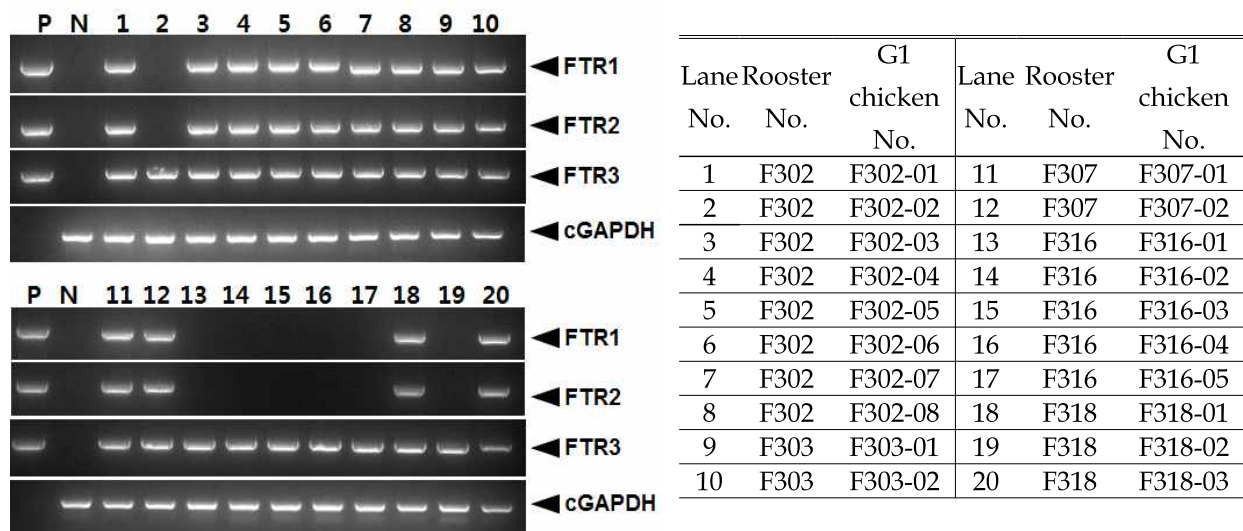


Fig. 130. PCR analyses of G1 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens derived from transgenic rooster no F302, F303, F307, F316 and F318. Genomic DNA was isolated from the blood of 20 transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서 부화한 수탉 중 정자에서 외래 유전자의 전이가 확인된 F403과 F416 G0 개체를 wild type의 암탉과 교미시켜서 G1 세대를 생산하고자 하였다. F403 group에서는 244개의 유정란 중 한 마리가 부화하여 약 0.4%의 형질전환율을 나타내었으며 F416 group은 206개의 유정란 중 한 마리가 부화하여 0.5%의 형질전환율을 나타내었다(Table 27). 각 group에서 생산한 G1 개체에서 실시한 genomic DNA PCR을 통해서 vector의 결실이 없는 것으로 확인되었다.

Table 27. Germline transmission rates from G0 founder rooster in forth experiment

G0 founder rooster No.	* Numer of G1 transgenic chicks/total offspring (%)	G1 transgenic chicken No.
F403	1/244 (0.4%)	F403-01
F416	1/206 (0.5%)	F416-01

* Transgenic chicks were identified by genomic DNA PCR

각 group에서 생산한 G1 개체에서 실시한 genomic DNA PCR을 통해서 3차 실험군과는 달리 전이된 vector의 결실이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 131).

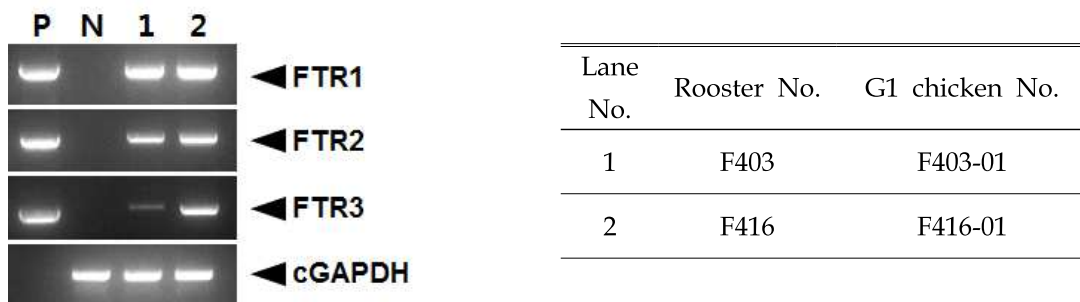


Fig. 131. PCR analyses of G1 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens derived from transgenic rooster no F303 and F416. Genomic DNA was isolated from the blood of 2 transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

③ G1 세대 형질전환 닭에 도입된 외래 유전자의 결실 여부 확인

Genomic DNA PCR 결과에서 형질전환 개체로 확인된 G1 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW 형질전환 닭을 대상으로 도입된 외래 유전자의 결실 여부를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. 각 G1 형질전환 개체의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 plasmid와 유전자가 전이되지 않은 닭의 genomic DNA, 그리고 G1 형질전환 닭의 genomic DNA에 각각 BglII와 KpnI 제한효소를 처리한 후 Southern blotting을 실시하였다. 실험 과정은 TetRNAi-cIGF1i-PTW G1 개체를 대상으로 한 실험과 동일하게 진행하였으며 probe는 tTS

서열에 대해서 제작한 것을 사용하였다. 실험 결과, negative 대조구인 정상 닭의 genomic DNA에서는 외래 유전자의 전이가 나타나지 않았고 제한효소를 처리한 G1 개체에서는 positive control인 plasmid DNA에서와 동일한 위치에서 단편이 확인되었다(Fig. 132). 따라서 G1 개체에 도입된 외래 유전자가 결실이 일어나지 않았음을 알 수 있었다.



Fig. 132. Southern blot analysis of G1 transgenic chickens. Genomic DNA of chickens was digested with BglII and KpnI and hybridized with the tTs probe. Lane P, pCDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW plasmid DNA; lane N, non-transgenic control chick; lanes F302-01 ~ F318-03, transgenic G1 chickens sired by transgenic G0 roosters.

G1 형질전환 개체의 cIGF-1 shRNA에 의한 IGF-1 발현 억제를 확인하기 위하여 doxycycline 이 첨가된 식이를 실시한 후 각 개체의 혈액 내 IGF-1 농도를 측정하였다. 그 결과, 대조구가 약 20 ng/ml의 농도를 나타낸 데 비해서 형질전환 개체군에서는 10 ~ 13 ng/ml의 낮은 농도를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 133). 이 중 전이된 외래 유전자의 일부가 deletion 된 것으로 확인된 F302-02 개체에서는 혈액 내 IGF-1의 농도가 대조구에 비해서 감소하지 않은 것으로 나타났다.

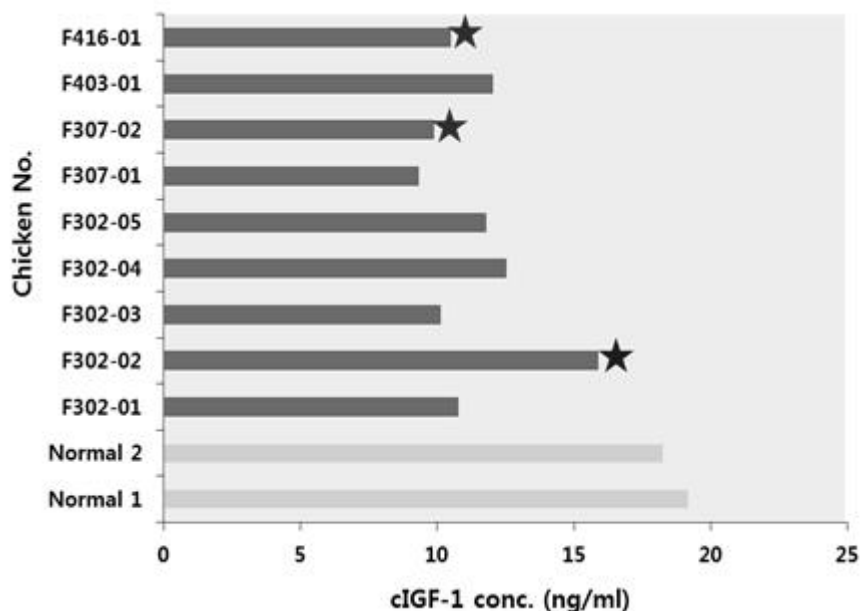


Fig. 133. Measurement of IGF-1 concentration in serum of G1 transgenic chickens. Lane Normal 1 and Normal 2, non-transgenic chickens; lanes F302-01 ~ F416-01, G1 transgenic chickens sired by G0 transgenic roosters.

G1 형질전환 개체 중 세 마리(Fig. 133에서 별표로 표시한 개체)와 정상 개체 두 마리를 선별하여 doxycycline이 첨가된 식이를 함으로써 IGF-1 shRNA의 발현에 의한 체중의 억제 정도를 확인하고자 하였다. 4주령으로 월령이 유사한 대조구 닭과 성장에 따른 개체의 체중을 비교한 결과 전이된 vector의 일부분이 결실된 형질전환 개체인 F302-02를 제외한 두 마리의 G1 개체에서 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 대조구는 3주간 131% 또는 144%의 성장 증가율을 나타낸 데 비해서 G1 개체인 F307-01과 F416-01은 각각 100%와 94%의 낮은 성장 증가율을 보였다(Table 28, Fig. 134). 따라서 본 연구에서 구축한 shRNA 유전자 전이 system에 의해서 닭의 성장 관련 유전자 발현을 억제할 수 있는 것으로 판단되었다.

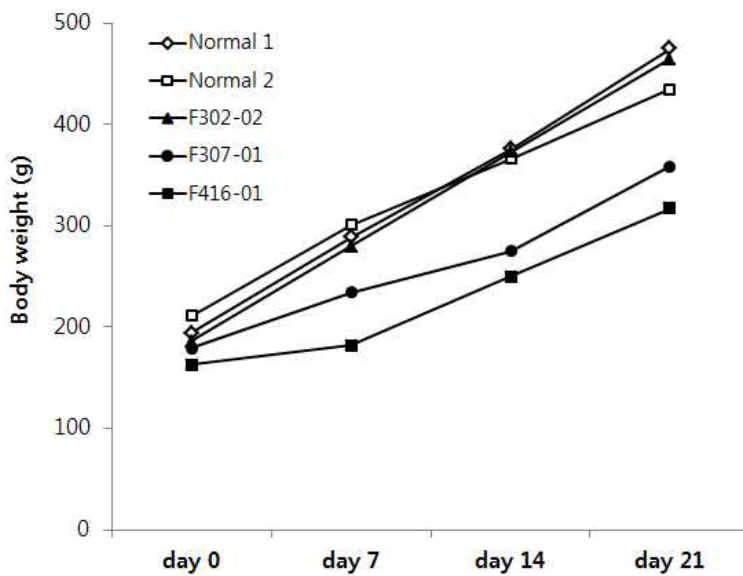


Fig. 134. Efficiency of tetracycline inducible shRNA expression in G1 CDF-TetRNAi-cIGF1i-PTW transgenic chickens.

Table 28. Increasing rate of body weight in G1 transgenic chickens

Chicken No.	Body Weight (g)				Increasing rate of body weight (%) (day 0 BW-day 21 BW/day 0 BW) ×100)
	day 0	day 7	day 14	day 21	
Normal 1	194	289	376	475	144%
Normal 2	201	301	366	465	131%
F302-02	186	280	373	465	150%
F307-01	179	234	275	359	100%
F416-01	163	182	250	317	94%

다. cIGF-1 shRNA가 도입된 1세대(G0) 애완용 녹색 형광 닭과 실키 오골계의 생산

(1) 1세대 미니 녹색 형광 닭의 개발

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염
 형질전환 닭의 생산에 필요한 고감염성의 virus는 전자의 실험에서와 마찬가지로 pTetRNAi-cIGF1i-PTW vector와 virus 생산 세포인 GP2 293, 그리고 virus packaging에 필요한 pVSV-G plasmid를 이용하여 virus를 생산한 후 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하여 준비하였다. 이 virus를 녹색 형광 닭이 산란한 유정란의 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 21일간 배양하였으며 부화율 및 형질전환율을 확인하였다.

(나) 1세대 형질전환 미니 녹색 형광 닭의 생산 및 분자생물학적 분석
 녹색 형광 닭의 유정란 확보가 원활하지 못하여 본 실험은 현재 3차만 실시하였다. 본 실험에서는 223개의 형광 닭 유정란을 사용하였으며 약 10%에 해당하는 23마리가 부화하였다 (Table 29).

Table 29. Hatchability of TetRNAi-cIGF1i-PTW virus injected GFP embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	223	23 (10.3)	11 (47.8)
2	184	46 (25)	7 (15.2)
3	191	15 (7.9)	2 (13.3)
Total	598	84 (14.0)	20 (23.8)

1차 실험에서 부화한 병아리를 대상으로 genomic DNA PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과 11마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 135). 이 중 수컷은 한 마리인 것으로 판명되었으나 생후 2개월에 폐사하였으며 현재 생존해 있는 개체는 유전자의 전이가 확인되지 않은 수컷 개체 3마리이다. 이 개체들은 성성숙이 완료된 후 정자를 채취하여 genomic DNA PCR을 실시함으로써 germline transmission의 가능성 여부를 확인하고자 한다.

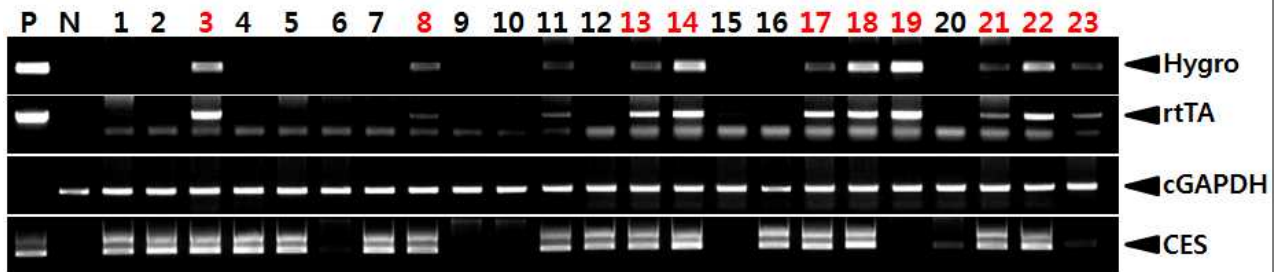


Fig. 135. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW GFP transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 23 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서는 부화한 46마리 중 외래 유전자의 전이가 확인된 개체는 17마리이고 이 중 2마리만 PCR 증폭이 정상적으로 일어났고 나머지 개체에서는 hygromycin 저항성 유전자나 rtTA 서열에 대한 PCR 반응 중 한 경우에서만 증폭이 이루어졌다(Fig. 136). 이러한 현상에 대한 원인은 개체에 전이된 vector 일부분의 결손 때문인 것으로 추정된다. 이에 성숙숙이 완료된 후, 각 수컷 개체의 정자에서 genomic DNA PCR을 실시하여 외래 유전자의 결실이 일어나지 않은 수컷만 선별하여 G1 생산에 사용해야 할 것으로 판단되었다.

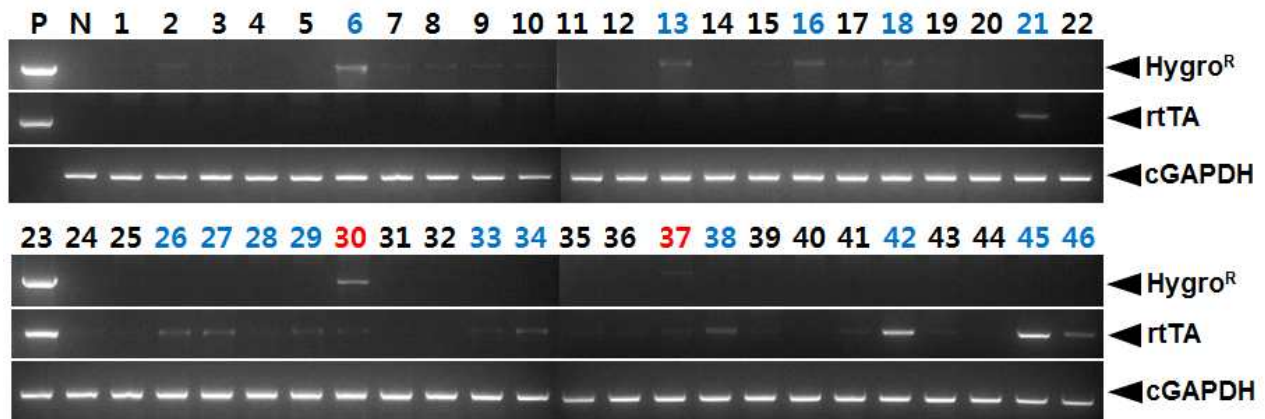


Fig. 136. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW GFP transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 46 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에서는 191개의 GFP 닭의 수정란에 TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 미세주입하여 15마리의 병아리를 얻을 수 있었다. 이 중 genomic DNA PCR을 이용하여 형질전환 개체로 확인된 G0 개체는 2마리이다(Fig. 137).

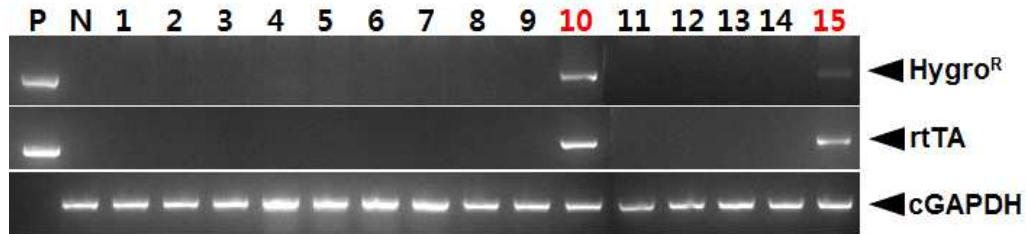


Fig. 137. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW GFP transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 15 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(2) 1세대 미니 실키 오골계의 개발

(가) 고농도의 virus의 생산 및 닭의 배반엽 세포로의 감염

본 실험에서 사용한 virus는 미니 녹색 형광 닭의 생산 실험에 사용한 것과 동일한 것으로 virus의 생산 및 배반엽 세포로의 미세주입, 그리고 대리난각 방법 등의 일련의 과정을 동일하게 진행하였다.

(나) 1세대 형질전환 미니 실키 오골계의 생산 및 분자생물학적 분석

미니 실키 오골계의 생산 실험은 4차에 걸쳐서 진행하였으며 621개의 virus를 주입한 유정란 중에 57개가 부화하였으며 약 21.7%의 부화율을 나타내었다. 이 중 형질전환 개체로 확인된 것은 15마리로 약 26.3%의 형질전환율을 보였으며 이 중 수컷은 10마리인 것으로 확인되었다(Table 30).

Table 30. Hatchability of TetRNAi-cIGF1i-PTW virus injected silky embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment	Number of eggs injected	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
1	203	43 (21.2)	6 (14.0)
2	60	14 (23.3)	9 (64.3)
3	172	7 (4.1)	3 (42.9)
4	186	11 (5.9)	3 (27.3)
Total	621	75 (12.1)	21 (28.0)

1차 실험군에서는 43마리의 부화한 병아리 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 6마리이며, 수컷과 암컷이 각각 4마리, 2마리인 것으로 확인되었다(Fig. 138). 현재는 형질전환이 확인되지 않은 개체만 생존해 있다.

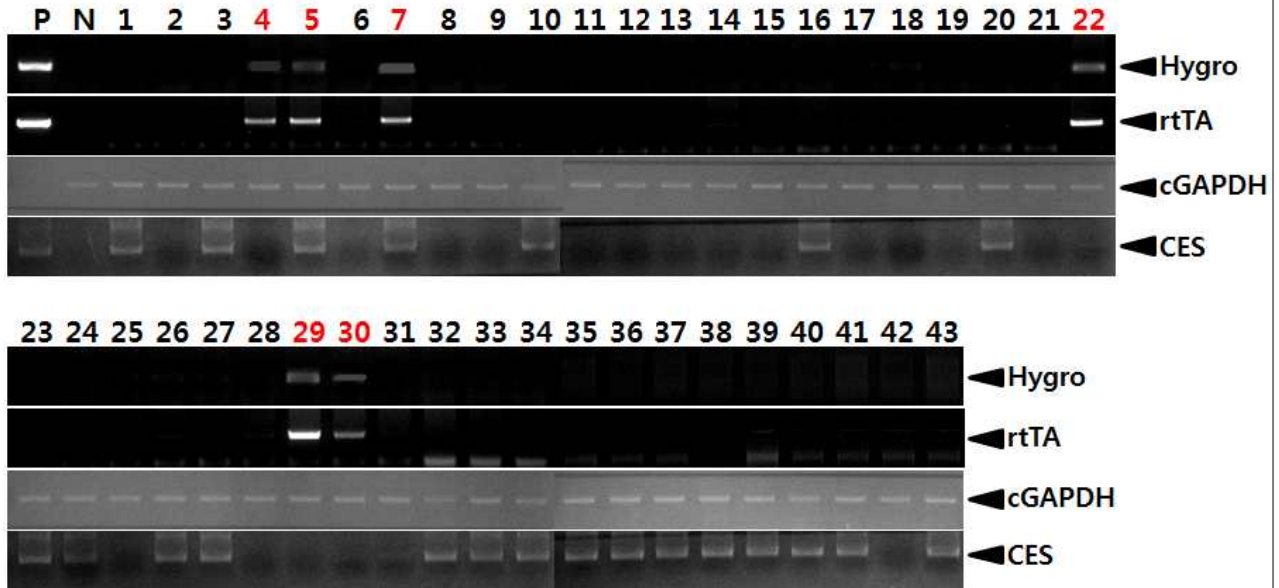


Fig. 138. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW silky transgenic chickens in the first experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 43 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

2차 실험군에서는 60개의 유정란에 virus를 미세주입하였으며 14마리의 병아리가 부화하여 23.3%의 부화율을 보였다. 이 중 PCR을 통해 유전자의 전이가 확인된 형질전환 개체는 9마리인데 수컷 6마리와 암컷 3마리로 확인되었다(Fig. 139). 현재 수컷 5마리와 암컷 한 마리, 그리고 유전자 전이가 확인되지 않은 수컷 한 마리를 포함하여 모두 7마리가 사육되고 있다.

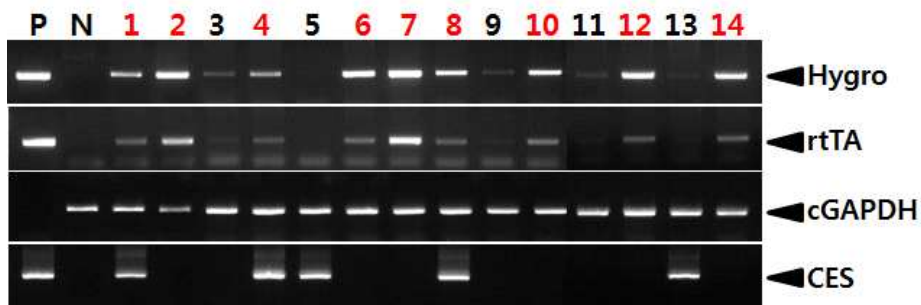


Fig. 139. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW silky transgenic chickens in the second experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 14 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

3차 실험군에서는 virus를 주입한 유정란 중 7개가 부화하였으며 이 중 3마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Fig. 140).

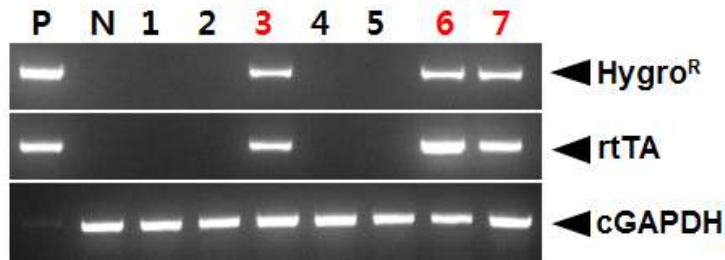


Fig. 140. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW silky transgenic chickens in the third experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험에서는 186개의 실키 오골계의 유정란에 TetRNAi-cIGF1i-PTW virus를 주입하여 11마리의 병아리를 생산하였다. 이 중 genomic DNA PCR을 통하여 형질전환 개체로 확인된 수는 3마리로 27.3%의 형질전환율을 나타내었다(Fig. 141).

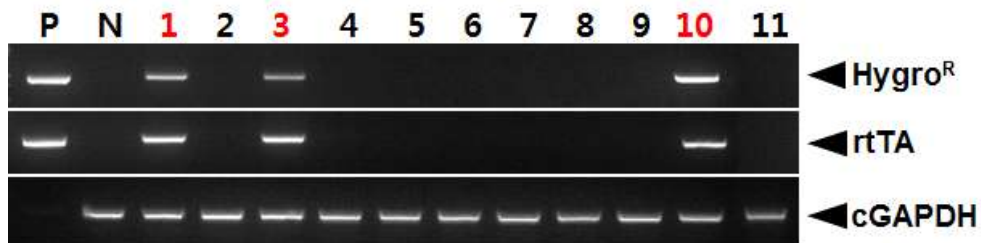


Fig. 141. PCR analyses of G0 TetRNAi-cIGF1i-PTW silky transgenic chickens in the fourth experiment. Genomic DNA was isolated from the blood of 11 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTetRNAi-cIGF1i-PTW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

현재까지 생산한 제1세대 형질전환 미니 녹색 형광 닭과 미니 실키 오골계는 성숙이 완료되지 않은 관계로 제2세대 개체 생산에는 좀 더 시간이 소요될 것으로 예상된다. 이에 제2세대 개체의 생산이 완료되는 대로 연구 결과를 도출하여 논문이나 학술발표 형식으로 보고하고자 한다.

제 3 절. 연구개발성과

1. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출 원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지식재산권 (발명특허)	세포외로 분비되는 녹색형광단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 이 유전자 발현을 위한 벡터	대한 민국	대구가 톨릭대 학교 산학협 력단	2012.08.01	10-2012-0084352				
지식재산권 (발명특허)	쥐 성장호르몬 유전자의 프로모터를 포함하는 레트로바이러스 발현 벡터	대한 민국	대구가 톨릭대 학교 산학협 력단	2014.05.12	10-2014-0053479				
지식재산권 (발명특허)	세포외로 분비되는 녹색형광단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 이 유전자 발현을 위한 벡터	대한 민국				대구가 톨릭대 학교 산학협 력단	2014.12.02	10-1470595	

2. 유전자원 등록

번호	유전자원명	등록기관	등록일	등록번호
1	Escherichia coli HB101/pLNcSGW	한국생명공학연구원 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures)	2012.07.10	KCTC 12240BP
2	Escherichia coli DH5α/pLNrgHpGW	한국생명공학연구원 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures)	2013.11.07	KCTC 12517BP

3. 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Quantitative Analysis of Tetracycline-Inducible Expression of the Green Fluorescent Protein Gene in Transgenic Chickens	Journal of Reproduction and Development	Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon	58 (6)	Japan	Society for Reproduction and Development	SCI
2	Modification of Enhanced Green Fluorescent Protein for Secretion Out of Cells	Biotechnology and Bioprocess Engineering	Ji Yeol Roh	18	Korea	The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	SCIE
3	Retrovirus-Mediated Gene Transfer	Transgenic animal technology (3 rd ed).	Bon Chul Koo		USA	Elsevier	비SCI (해외저서)
4	Unanticipated Gene Deletion in the Transgenic Chicken Employing Ovalbumin Promoter for Oviduct Specific Expression	Reproduction and Developmental Biology	Tae Young Jang	37 (3)	대한민국	The Korean Society of Animal Reproduction	비SCI
5	새로운 Tetracycline 유도적 유전자 발현 System의 <i>In Vitro</i> 검정	Reproduction and Developmental Biology	권모선	37 (3)	대한민국	The Korean Society of Animal Reproduction	비SCI
6	Tetracycline 유도적인 RNAi system을 이용한 생쥐 성장 관련 유전자의 발현 억제	Reproduction and Developmental Biology	손혜진	38 (3)	대한민국	The Korean Society of Animal Reproduction	비SCI
7	hEPO 유전자의 유전조각 특이적 발현에 대한 <i>in vitro</i> 검정	Reproduction and Developmental Biology	권모선	40 (1)	대한민국	The Korean Society of Animal Reproduction	비SCI

4. 학술회의 발표

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국동물번식학회 2012년도 춘계학술대회 (발표제목:Tetracycline Inducible Knockdown of Chicken <i>IGF-1</i> Gene Expression by Small Interfering RNA Vector System In Vitro)	JY Roh, BC Koo, MS Kwon, MJ Kim, T Kim	2012.06.21	대전광역시 충남대학교	대한민국
2	The Society for Reproduction and Development (발표제목:Improved Performance of the 3rd Generation of Tetracycline-Inducible System <i>In Vitro</i>)	MS Kwon, MJ Kim, JY Roh, BC Koo, T Kim	2012.09.06	일본 Tsukuba 대학	일본

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
3	제12회 발생공학 국제 심포지엄 및 학술대회 (발표제목: <i>In vitro</i> 에서의 tetracycline에 의해 유도되는 RNAi vector system을 이용한 mIGF과 mGHR의 발현 억제)	노지열, 구본철, 권모선, 김민지, 김상아, 손혜진, 김태완	2012.10.25	제주 국제컨벤션 센터	대한민국
4	한국동물번식학회 2013년도 춘계학술대회 (발표제목:Tetracycline 유도적 RNAi Vector System을 이용한 <i>cGH</i> 유전자의 발현 억제)	노지열, 구본철, 권모선, 김민지, 김태완	2013.06.20	건국대학교 글로벌 캠퍼스	대한민국
5	NUCLEIC ACID SUMMIT (발표제목:Modification of Enhanced Green Fluorescent Protein for Secretion Out of cells)	TA Kim, JY Roh, MS Kwon, MJ Kim, NH Kim	2013.06.21	SAN FRANCISCO, CA	미국
6	제13회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:뇌하수체전엽 특이적인 Promoter의 확립 및 <i>In Vitro</i> 검정)	구본철, 권모선, 노지열, 김민지, 김태완	2013.10.25	충북대학교 개신문화관	대한민국
7	제13회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목: <i>hEPO</i> 유전자가 발현되는 형질전환 닭의 생산)	구본철, 권모선, 노지열, 김민지, 김태완	2013.10.25	충북대학교 개신문화관	대한민국
8	한국동물번식학회 2014년도 정기학술대회 (발표제목:유선조직 특이적인 <i>hEPO</i> 유전자 발현의 <i>In Vitro</i> 검정)	구본철, 권모선, 윤소정, 김태완	2014.07.03	제주대학교 국제교류회관, 대회의실	대한민국
9	한국동물번식학회 2014년도 정기학술대회 (발표제목:닭의 정조줄기세포의 분리 배양 및 외래 유전자의 전이)	구본철, 권모선, 김상아, 손혜진, 김태완	2014.07.03	제주대학교 국제교류회관, 대회의실	대한민국
10	The 3 rd Korea-China-Japan Joint Symposium on Animal Reproduction (발표제목:Knockdown of Mouse <i>IGF-I</i> and Mouse <i>GHR</i> Genes in Mouse Liver Cells by RNA Interference)	BC Koo, MS Kwon, T Kim	2014.07.04	Jeju National University International Center	대한민국
11	제14회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:Construction and in vitro assay of piggyBac vector system for the mammary gland tissue specific <i>hEPO</i> gene expression)	BC Koo, MS Kwon, T Kim	2014. 10. 24	서울대학교	대한민국
12	제14회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:Knockdown of chicken GH gene expression using tetracycline-inducible RNAi system)	BC Koo, MS Kwon, S Kim, HJ Son, T Kim	2014. 10. 24	서울대학교	대한민국

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
13	SSR 2015 Annual Meeting - 48 th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (발표제목:Generation of the transgenic pig carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes)	HJ Oh, JH Moon, EJ Park, Candrani Khoirinaya, SH Lee, GY Song, GA Kim, T Kim, BC Lee	2015. 06. 18	San Juan	Puerto Rico
14	한국동물번식학회 2015년도 정기학술대회 (발표제목:조혈 촉진 인자 유전자가 발현되는 형질전환 닭의 개발)	구본철, 권모선, 김태완	2015. 07. 02	강원대학교	대한민국
15	한국동물번식학회 2015년도 정기학술대회 (발표제목:Retrovirus vector system을 이용하여 생산한 형질전환 닭에서의 유전자 결손)	구본철, 권모선, 김태완	2015. 07. 02	강원대학교	대한민국
16	제15회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:IGF-1 유전자에 대한 RNAi system을 이용한 형질전환 닭의 개발)	구본철, 권모선, 김태완	2015. 10. 23	중앙대학교	대한민국
17	제15회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:hEPO 형질전환 닭의 계통 확립 및 닭에서 발현된 hEPO의 분자생물학적 분석)	구본철, 권모선, 김태완	2015. 10. 23	중앙대학교	대한민국
18	한국동물번식학회 2016년도 정기학술대회 (발표제목:Efficient expression of recombinant hEPO in germline transgenic chickens by using a MoMLV vector system)	구본철, 권모선, 김태완	2016. 06. 16	전북대학교	대한민국
19	한국동물번식학회 2016년도 정기학술대회 (발표제목:Knockdown of chicken <i>IGF-1</i> gene expression in chicken embryonic fibroblast cell by using lentiviral vector expressing shRNA)	구본철, 권모선, 김태완	2016. 06. 16	전북대학교	대한민국
20	제16회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:Production of germline transgenic chickens expressing high levels of recombinant hEPO using a MoMLV-based retrovirus vector)	구본철, 권모선, 김도향, 김상아, 최무석, 남유화, 김태완	2016. 10. 28	대구대학교	대한민국
21	제16회 발생공학 국제 심포지엄 (발표제목:Expression of active human interferon alpha 2b gene under the control of ovalbumin promoter in transgenic chickens)	구본철, 권모선, 김도향, 김상아, 최무석, 남유화, 김태완	2016. 10. 28	대구대학교	대한민국

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

D-06

제 1 절. 목표달성도

연차	연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	개발 내용 및 개발 범위	달성도
1차년도 (2011)	cGHR과 cIGF-I의 발현을 저하시킬 수 있는 retrovirus vector system의 개발 및 <i>in vitro</i> 검증	cGHR과 cIGF-I의 발현을 저하시킬 수 있는 retrovirus vector system의 개발	50%	cGHR 혹은 cIGF-I 유전자가 활발하게 발현되는 조직에서 특이적으로 작동하는 promoter (GH는 neuron specific promoter, IGF-I은 liver specific promoter)의 cloning 및 발현 조절 여부 확인 cGHR 혹은 cIGF-1 유전자를 target으로 하는 shRNA design shRNA vector sequence가 도입된 retrovirus vector와 one-vector 형태의 Tet virus vector의 구축	100%
		cGHR shRNA와 cIGF-I shRNA 발현에 의한 knock-down 효과의 <i>in vitro</i> 검증	50%	각각 구성된 virus vector system의 knock-down 효율의 <i>in vitro</i> 검증 cGHR과 cIGF-1의 발현이 억제되는 형질전환 mouse의 제작(2차년도 연구 계획에 포함되어 있는 부분) cGHR shRNA와 cIGF-I shRNA가 전이된 형질전환 닭의 생산	100%

연차	연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	개발 내용 및 개발 범위	달성도
2차년도 (2012)	cIGF-1 shRNA가 도입된 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산 및 cGH shRNA 발현을 위한 virus vector의 구축	cIGF-1 shRNA가 도입된 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산	30%	cIGF-1 유전자 발현의 knock-down 효율이 가장 좋은 shRNA가 도입된 tetracycline-inducible retrovirus vector와 lentivirus vector의 구축 전단계에서 구축한 IGF-1 shRNA가 도입된 각각의 virus vector의 knock-down 효율에 대한 <i>in vitro</i> 검정 실시 각 virus vector system을 이용하여 고농도의 virus stock 생산 Stage X기 유정란의 배반엽층에 농축된 virus를 미세주입한 후 대리난 각 부화 방법으로 1세대(G0) 형질전환 닭 생산	100%
		형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인	20%	성성숙이 완료된 G0 형질전환 개체의 생식세포에서 shRNA 서열의 전이를 genomic DNA PCR 방법으로 확인 생식세포로의 shRNA의 전이가 확인된 G0 형질전환 닭으로부터 G1 세대의 형질전환 닭 생산	100%
		cGH 유전자의 발현을 저하시키기 위한 cGH shRNA 제작 및 virus vector의 구축	20%	cGH 유전자를 target으로 하는 shRNA design 각 cGH shRNA 서열을 tetracycline-inducible retrovirus vector와 lentivirus vector에 도입 각각의 virus vector의 knock-down 효율에 대한 <i>in vitro</i> 검정을 실시하여 가장 효율적인 cGH shRNA가 도입된 virus vector 선별	100%
		개발한 virus vector를 이용한 1세대(G0) 형질전환 닭의 생산	30%	선별된 virus vector system를 이용하여 고농도의 virus stock 생산 Stage X기 유정란의 배반엽층에 1,000배 농축된 virus를 미세주입한 후 대리난 각 부화 방법으로 1세대(G0) 형질전환 닭 생산	100%

연차	연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	개발 내용 및 개발 범위	달성도
3차년도 (2013)	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형 형질전환 닭의 생산 및 다음 세대(G1과 G2) 생산 시도	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형 형질전환 닭의 생산	40%	<p>닭의 성장 관련 유전자에 대한 shRNA가 도입된 각 vector의 일부 서열 보완</p> <p>구축한 vector system를 이용한 고농도의 virus stock 생산</p> <p>Stage X기 유정란의 배반엽층에 1,000배 농축된 virus를 미세주입한 후 대리난각 부화 방법으로 1세대(G0) 형질전환 닭 생산</p>	100%
		생식세포로의 shRNA 서열이 전이된 1세대(G0) 형질전환 닭의 선별	20%	<p>성숙숙한 1세대 형질전환 수탉에서 채취한 sperm에서 genomic DNA 분리</p> <p>Genomic DNA PCR을 실시하여 생식세포로의 shRNA 서열이 전이된 G0 형질전환 닭의 선별</p>	100%
		2세대(G1) 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석	20%	<p>생식세포에 shRNA 서열이 전이된 수탉을 wild type의 암탉과 교배하여 G1 생산</p> <p>생산한 G1 개체의 혈액을 채취하여 genomic DNA PCR 방법으로 형질전환 개체 선별</p> <p>선별된 G1 개체를 대상으로 Southern blotting을 실시하여 전이된 유전자의 copy 수 확인</p>	100%
		3세대(G2) 형질전환 닭의 생산 시도	20%	G1 형질전환 개체와 wild type의 닭들을 교배하여 G2 개체 생산	100%

연차	연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	개발 내용 및 개발 범위	달성도
4차년도 (2014)	형질 전환 미니 닭의 분자생물학적 검정 및 2세대 미니 닭의 생산	Virus vector system을 이용한 1세대(G0) 애완용 소형 형질전환 닭의 추가 생산	20%	전년도에 생산한 G0 형질전환 개체 중에서 사양 과정에서 폐사한 개체가 비교적 많은 관계로 추가적인 G0 형질전환 개체 생산이 요구됨 이에 전년도에 구축한 vector system를 이용한 고농도의 virus stock 생산 Stage X기 유정란의 배반엽층에 1,000배 농축된 virus를 미세주입한 후 대리난각 부화 방법으로 G0 형질전환 닭을 추가적으로 생산함	100%
		생식세포로의 shRNA 서열이 전이된 1세대(G0) 형질전환 닭의 선별	20%	성숙한 1세대 형질전환 수탉에서 채취한 sperm에서 genomic DNA 분리 Genomic DNA PCR을 실시하여 생식세포로의 shRNA 서열이 전이된 G0 형질전환 닭의 선별	100%
		2세대(G1) 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적, 생리학적 검정	30%	생식세포에 shRNA 서열이 전이된 수탉을 wild type의 암탉과 교배하여 G1 생산 생산한 G1 개체의 혈액을 채취하여 genomic DNA PCR 방법으로 형질전환 개체 선별 선별된 G1 개체를 대상으로 Southern blotting을 실시하여 전이된 유전자의 copy 수 확인 2세대 형질전환 애완용 미니 닭의 doxycycline 식이에 따른 혈중 IGF-I 농도 변화 분석을 실시함으로써 cIGF-1 shRNA의 knock-down 효율 검정 G1 형질전환 개체와 wild type의 닭들을 교배하여 G2 개체 생산 시도	100%
		녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 소형화	30%	전 단계에서 구축한 shRNA가 도입된 tetracycline-inducible virus vector system에서 고농도의 virus 생산 생산한 virus를 본 연구실에서 보유하고 있는 녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 유정란의 배반엽층에 미세주입하여 형질전환 미니 닭의 생산	100%

연차	연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	개발 내용 및 개발 범위	달성도
5차년도 (2015)	형질 전환 미니 닭의 계통 확립 및 대량 번식	3세대(G2) 형질 전환 닭의 생산	30%	G1 형질전환 개체와 wild type의 닭들을 교배하여 G2 개체 생산 생산된 G2 개체의 분자생물학적 분석 실시	100%
		2세대 및 3세대 형질 전환 애완용 미니 닭의 분자생물학적, 생리학적 검정 및 번식 육종	30%	2세대 및 3세대 형질전환 애완용 미니 닭의 doxycycline 투여 여부에 따른 혈중 IGF-I 농도 분석 및 외형적 특성(체고, 체중 등) 분석 2세대 및 3세대 형질전환 애완용 미니 닭의 번식 및 육종	100%
		녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 소형화를 통한 고부가가치 애완용 미니 닭의 생산	20%	전 단계에서 구축한 tetracycline-inducible cIGF-1 shRNA가 도입된 virus vector system을 이용한 고농도의 virus 생산 생산한 virus를 본 연구실에서 보유하고 있는 녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 유정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 형질전환 개체 생산	100%
		애완용 미니 녹색 형광 닭과 국내 재래종 관상용 닭의 분자생물학적, 생리학적 분석 실시	20%	생산된 형질전환 닭의 분자 생물학적 분석을 위하여 genomic DNA PCR과 Southern blotting 실시 형질전환 닭의 doxycycline 공급에 따른 cIGF-1 shRNA의 knock-down 효율에 대한 <i>in vitro</i> 와 <i>in vivo</i> 검정 실시 생산된 형질전환 미니 닭의 분자생물학적 분석 실시	100%

제 2 절. 관련분야에의 기여도

현재 소득의 증가와 더불어 국내외 애완동물의 시장은 급속도로 팽창해 가고 있으며, 종래의 개나 고양이 그리고 관상용 조류에서 파충류, 어류와 곤충에 까지 애완동물의 영역은 거의 모든 종의 동물을 아우르고 있다. 닭의 경우 여러 관상용 닭이 보급되어 있으나 애완동물로서의 수용 확대에 있어서 가장 큰 문제점은 체구가 실내에서 사육하기에 너무 크다는 점이다. 유전 공학을 이용하여 관상용 닭을 소형화할 경우, 그 닭의 시장성은 아주 클 것으로 예상된다. 실제 말레이시아에서는 체고가 15cm 정도인 미니 닭이 애완동물로 인기가 있는데 1 마리 당 가격이 최고 US \$ 5,500에 이른다. 닭은 포유동물에 비해 성숙 기간과 세대간격이 짧고, 번식능력이 탁월하며, 형질전환이 이루어진 가금의 계통성립이 용이하고, 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하기 때문에 비교적 적은 연구비와 짧은 연구기간 내에 성공적인 결과를 도출할 수 있다. 본 연구에서는 tetracycline 유도적인 RNAi vector system을 구축하여 닭의 성장 관련 유전자의 발현을 억제함으로써 애완동물 형질전환 미니 닭을 생산하고자 하였다. 이러한 유전공학 기술을 이용한 동물을 소형화하는 연구는 세계적으로도 매우 독창적 연구라고 판단된다. 동물의 성장에는 성장호르몬, 인슐린-유사 성장인자, 그리고 이들 호르몬에 대한 수용기 등이 관여한다고는 알려지고 있으나 이들 각각에 대한 정확한 생리학적 기전은 현재까지 많이 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서 생산된 미니 닭은 조류의 성장과 관련된 생리적인 특성 연구에도 기여할 수 있을 것이다. 성장 관련 shRNA를 전이시키기 위하여 도입한 tetracycline 유도적인 vector system은 형질전환 개체 내에서의 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 매우 효율적인 수단으로서 외래 유전자의 조직 특이적인 발현과 동시에 tetracycline 계열의 물질 공급 여부에 따라서 발현의 유도적 조절이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 이러한 vector system을 이용해서 성장 관련 shRNA 발현을 turn on / off하여 형질전환 미니 닭의 성장 및 증식을 효율적으로 조절할 수 있도록 하였다. 기존의 형질전환 닭의 생산에 관한 연구는 주로 효율이 높은 형질전환 닭의 생산 방법에 대한 내용이거나 형질전환 닭의 혈액이나 계란을 통해 생리활성단백질을 생산하는 데 관한 연구들이 주를 이루었다. 본 연구 과제에서는 외래단백질 생산 촉진이 아닌 닭의 성장 관련 유전자의 발현을 억제하여 미니 닭을 생산하고자 하였으며 이러한 연구 결과는 현재까지 보고된 바가 없으므로 학문적으로도 큰 관심을 불러일으킬 수 있을 것으로 예상하였다. 형질전환 미니 닭의 개발은 단순히 애완동물로서의 가치뿐만 아니라 성장 저해 질환 연구에 있어서도 매우 유용한 실험동물 모델이 될 수 있을 것이며 미니 닭의 계통이 확립된다면 애완동물 또는 질환 모델 동물로서 안정적이고 경제적인 공급이 가능해질 것으로 전망된다.

제 5 장. 연구결과의 활용계획

D-07

제 1 절. 추가연구의 필요성

본 연구에서는 5년의 연구 기간 동안 형질전환 미니 닭의 생산을 위한 성장관련 유전자 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 vector system을 구축하고 이를 이용한 형질전환 개체를 생산하였다. 하지만 생산된 형질전환 개체에 대한 정밀한 생리학적 분석 등의 연구를 실시하기에는 시간적인 한계가 있었다. 이에 본 연구에서 개발한 형질전환 미니 닭에 대한 보다 추가적인 분자생물학적 생리학적 분석 연구가 필요할 것으로 판단된다. 이 외에도 구축한 vector system을 다른 애완용 동물에 적용하게 되면 다양한 종의 미니 동물을 생산할 수 있을 것으로 예상된다.

제 2 절. 타 연구에의 응용

본 연구에 있어서 가장 중요한 핵심은 성장에 관여하는 유전자의 발현을 억제하기 위한 shRNA의 활성을 효율적으로 조절할 수 있는 vector system의 구축이다. 이러한 system의 구축을 통하여 성장 관련 유전자의 발현 억제가 세포 수준이 아닌 하나의 완전한 동물개체 수준에서 이루어진다면 애완용 형질전환 미니 닭의 개발뿐만 아니라 질환 모델 연구나 사람의 유전자 치료 및 이종 장기 관련 연구를 비롯한 의학 연구 분야에도 적용될 수 있다. 또한 본 형질전환 기술을 이용한 애완용 소형 닭 생산을 위한 연구 결과는 최초의 정량적 성과 지표에 미치지 못하였으나 차후 형질전환 동물을 이용한 연구에 있어서 기초 자료로 활용 가능할 것으로 예상된다. 이에 타 연구 기관이나 연구실에서 이 system의 분양을 의뢰할 경우 연구의 타당성을 검토하여 분양할 것이며 본 연구 결과를 특허로 등록하거나 출원하여 경제적인 가치를 창출하고자 한다.

제 3 절. 기업화 추진방안

국내 및 국외시장 분석결과 애완동물 시장은 예상보다 그 규모가 광범위하며, 사회적 경제적 생활 여건으로 인하여 차후 급격하게 시장 규모가 증가할 것으로 예상된다. 현재는 주로 개나 고양이를 애완동물로 키우는 가정이 많으나 앞으로는 도시를 중심으로 하는 인구 수의 증가나 주거난 등으로 인해 공동주택 생활이 많아지게 되면서 사육 비용이 적게 들고 손쉽게 기를 수 있는 애완동물에 대한 수요가 증가할 것이다. 그리고 희귀종에 대한 소유 욕구가 증가할 것으로 예상되며 이에 따라 본 연구에서 생산하고자 하는 미니 형광 닭이나 재래종 관상용 닭의 국내 및 국외 판매가 획기적인 경제적 성과를 거둘 수 있을 것이다.

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08
애완용 형질전환 소형 동물의 생산에 관한 연구는 현재까지 보고된 성공적인 연구 결과가 전무한 실정이다. 이에 본 연구와 관련된 기술 정보들은 수집이 용이하지 않다.

제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
일반과제 (「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음)	

제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	D-11
<p>(1) 연구 활동 종사자 환경안전교육 실시</p> <p>(가) 정기 교육 - 대학원 신입생을 대상으로 년 1회 이상 안전교육 실시, 환경 안전 교육 미이수자는 실험실 출입 제한, 안전교육 수료자에게는 수료증을 교부하였음</p> <p>(나) 수시 교육 - 실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 비정기적으로 안전교육을 실시하였음</p>	
<p>(2) 실험실 안전점검 실시</p> <p>- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제8조와 제9조에 명시된 안전 점검 실시와 정밀 안전 진단 실시는 본 법률의 제10조 2항에 따라 미래창조과학부장관에 등록된 안전 점검 대행 기관에 의뢰하여 정기적인 점검을 실시하였음</p> <p>(가) 정기점검 - 안전 점검 대행 기관에 의뢰하여 년 1회 이상 정기적인 안전 점검을 실시하고 대학 내의 환경·소방·안전 점검반을 편성하여 매년 1회 이상 건물별로 순회하여 점검표의 내용에 적합한 실험·실습실 환경안전 정기점검을 실시함</p> <p>(나) 정밀안전진단 - 연구실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정하는 경우에는 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제7조의 규정에 따른 정밀안전진단지침에 따라 정밀안전진단을 실시하고 도출된 위해요인에 대한 적절한 안전 조치가 이루어지도록 책임자에게 통보하였음</p>	
<p>(3) 실험실 안전사고 대응 및 예방</p> <p>- 실험 과정에서의 감염 및 오염을 방지하기 위하여 연구실 내의 각 실험 장소를 철저히 격리하여 관리하고, 정기적인 소독 및 연 1회 이상 연구실 안전 점검을 실시함</p> <p>- 완전 밀폐형 시약장 및 안전 캐비닛 설치, 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시, 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락망을 조직하여 신속한 사고 대응이 이루어지도록 함</p>	
<p>(4) 유전자 변형 생물(LMO) 실험실 안전관리</p> <p>- 「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률」(2014. 11)에 의거하여 유전자 변형 생물 취급자에 대한 안전교육을 실시하였음</p> <p>- 1등급 LMO 실험실에 대한 관리 운영 대장 작성 및 보관하였음</p> <p>- LMO 취급시 주의 사항 및 위해 방지를 위한 비상 조치 방법을 강구하였음</p>	

(5) 연구 활동 종사자 정기적인 건강검진 실시

- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구 활동 종사자에 대하여 정기적인 건강 검진 실시

제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	D-12			
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	취 성장호르몬 유전자의 프로모터를 포함하는 레트로바이러스 발현 벡터	대구가톨릭대학교 산학협력단		대한민국		2014.05.12	중복사사	
2	특허	세포외로 분비되는 녹색형광단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 이 유전자 발현을 위한 벡터	대구가톨릭대학교 산학협력단		대한민국		2014.12.02	중복사사	
3	논문	Quantitative Analysis of Tetracycline-Inducible Expression of the Green Fluorescent Protein Gene in Transgenic Chickens	대구가톨릭대학교 산학협력단	교신저자	Journal of Reproduction and Development	1.76	2012.07.31	중복사사	SCI
4	논문	Modification of Enhanced Green Fluorescent Protein for Secretion Out of Cells	대구가톨릭대학교 산학협력단	교신저자	Biotechnology and Bioprocess Engineering	1.28	2013.11.30	중복사사	SCI
5	논문	Tetracycline 유도적인 RNAi system을 이용한 생쥐 성장 관련 유전자의 발현 억제	대구가톨릭대학교 산학협력단	교신저자	Reproduction and Developmental Biology		2014.09.01	중복사사	

제 11 장. 기타사항

	D-13
--	------

○

제 12 장. 참고문헌

D-14

1. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
2. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
3. Cunningham SM, Cunningham MD, Zhu L, Kain S (1997): Determination and correlation of expression levels of luciferase and EGFP using the tetracycline-controlled gene expression system and fluorescence imaging. *Neuroscience Abs* 23;647.
4. Dana S, Karin M (1989): Induction of human growth hormone promoter activity by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway involves a novel responsive element. *Science* 245:815-21.
5. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
6. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
7. Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547 - 5551.
8. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
9. Jin YX, Jeon Y, Lee SH, Kwon MS, Kim T, Cui XS, Hyun SH, Kim NH (2014): Production of Pigs Expressing a Transgene under the Control of a Tetracycline-Inducible System. *PLoS One* 9(1):e86146.
10. Karlas A, Kurth R, Denner J (2004): Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 325:18-23.
11. Kodama D, Nishimiya D, Iwata K, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motono M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S (2008): Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun* 367:834-839.
12. Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, Chang W, Jeon I, Park JK, Park JB, Kim T. 2006: Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260

13. Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Kim JH, Park YY, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim JH, Roh JY, Kim NH, Kim T (2008): Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.
14. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25:402-408.
15. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A (2001): Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 229:141-162.
16. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Gene Dev* 16:948-958.
17. Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT, Chang WK (2006): Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. *J Biotechnol* 122:362-371.
18. Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM (1998): Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 12:233-247.
19. Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, Vance A, Duncan J, Wells K, Ayares D (2009): Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 16:164-180.
20. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963 - 7968.
21. Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das AT (2006): Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther* 13:1382-1390.
22. Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T, Elias JA (2001): Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible over expression transgenic mice. *J Biol Chem* 276:25222-25229.
23. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.