

(19th)

636.50821

L2932

최 종  
연구보고서

질병저항성 유전자 전이 닭 생산에 관한 연구  
Studies on the production of transgenic chicken  
transferred disease resistance-related gene

서울대학교

농림부



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “질병저항성 유전자 전이 닭 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 31일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 한 재 용

세부연구책임자 : 신 영 수

세부연구책임자 : H. S. Lellihoj

연 구 원 : 김 진 남

연 구 원 : 김 귀 숙

연 구 원 : 이 영 목

연 구 원 : 이 민 호

연 구 원 : 서 삼 렬

연 구 원 : 문 지 훈

연 구 원 : 이 수 정

# 요 약 문

## I. 제 목

### 질병 저항성 유전자 전이 닭 생산에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 가금, 특히 닭으로부터 질병 저항성 유전자를 클로닝하여 유전체 구조 및 생물학적 특성 구명을 하며, 클로닝된 질병 저항성을 이용한 형질전환 닭을 생산하는데 있다. 또한, 형질전환 닭 생산을 위하여 원시생식세포 및 체외배양법을 이용하여 최적의 조건을 확립하며, 외래 유전자의 유전체내 안정적인 삽입을 위한 레트로바이러스 벡터의 이용 가능성을 타진하는데도 그 목적이 있다.

현재 닭의 경우는 질병에 무방비 상태이고 병아리에서 고기로 출하되기 직전까지 백신이나 치료제 또는 항생제에 의존하여 질병을 예방한다고 해도 무리는 아니다. 부화하자마자 마택이나 전염성 기관지염 백신에서 산란계의 경우는 산란 저하 증후군에 이르는 기본적 질병 예방 백신이 10여가지에 이르고 있어 이에 의한 백신 비용이나 항생제에 드는 비용 때문에 의하여 생산비 증가로 인한 경쟁력의 악화가 큰 문제가 되고 있으며 이에 대한 뚜렷한 대책도 없는 실정이다. 따라서 질병 저항성 유전자 도입 기법에 의해 한 계통의 종계를 만들었을 경우 예상되는 시장은 1000억원 이상이 될 것으로 기대되며 이로 인한 막대한 의화 대치 효과도 예상된다. 또한 대부분의 백신이나 치료 약이 대부분 수입에 의존하고 있어 이에 따르는

외화 손실 및 항생제 등의 잔류 문제로 국가경제 및 국민 건강 촉진의 측면에서 상당한 손실이 아닐 수 없다. 따라서 질병 저항성 유전자 도입 닭의 생산 시스템 및 생산의 확립이 요구되며 이에 대한 육성 정책이 시급하다. 이러한 가능성은 현재의 유전공학기술, 세포발생공학 기술에 의한 형질 전환 동물의 생산으로 가능할 것으로 예상된다. 형질전환 동물의 생산은 마우스등에서는 많은 성과를 거두고 있으며 질환모델과 관련하여 특정 질병유전자가 발현되거나 아니면 저항성 유전자를 도입하여 형질저항성을 증가시키는 형태의 연구들이 진행되고 있다. 또한 이러한 실험동물에서의 성과를 대동물에 적용시키려는 시도들이 이루어지고 있으나, 아직은 미진한 상태이다. 닭은 형태학적, 발생학적 차이 때문에 포유류와 같이 수정란에 외래 유전자를 미세주입하는 방법은 어렵다. 마우스 및 돼지에서 질병 저항성 유전자를 이용한 형질전환 동물의 생산은 보고가 되었으나, 마우스를 제외하고는 뚜렷한 결과가 없는 상황이다. 그렇지만 매년 질병이나 항생제 및 치료제가 전체 생산비에 차지하는 비중이 자꾸 높아지는 상황에서 닭 생산 산업에 있어서는 이러한 부분이 무엇보다도 중요한 문제로 부각되고 있다. 이러한 이유 때문에 유전 공학적 기법을 도입한 인테페론과 인터루킨 유전자와 같은 질병 저항성 유전자를 가지는 형질전환 닭이 생산되어 이것이 실제 농가에 보급되고 가금 개량에 응용된다면, 막대한 시간과 비용을 절감할 수 있으며 기존의 재래적인 개량 방법을 획기적으로 발전시킬 수 있을 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 초기 발생시기별 원시생식 세포의 분리방법 확립

- 생식선 반월로 부터 원시생식세포 분리
- 혈관으로부터 원시생식세포 분리

- 원시생식기로부터 원시생식세포 분리
- 2. 혈관내 미세 주입법 개발
  - 배발달 과정중 혈관내 미세주입법 개발
- 3. 체외 배양 시스템 조성
  - 체외 배양시설 환경 조성
  - 수정란 생산 공급 체계 확립
  - 체외 배양액 개발
  - 대리난각 공급을 위한 대량별균체계 확립
  - 초기배자 물리적 조작의 발생영향 검토
- 4. 질병저항성 유전자 확보
  - PCR에 의한 질병저항성 유전자 클로닝
  - 닭 T-cell cDNA library screening
- 5. 원시생식세포의 배양조건 확립
  - 최적의 배양액 조성 확립
  - PKH2, PKH26등의 염색에 의한 원시생식세포 분열 확인
  - 생식선 반월, 혈관계, 원시생식기의 원시생식세포별 배양 성적비교
- 6. 원시생식세포 이용 생식선키메라 생산 체계 확립
  - 수용체에 안정적 주입 기법 확립
  - 후대검정에 의한 키메라율 검증
  - 생식선 키메라 안정적 생산
- 7. 대리난각 배양법 개발 (In vitro culture) 에 의한 개체 생산
  - 체외배양법에 의한 개체의 안정적 생산
- 8. 질병저항성 유전자 검증
  - 질병저항성 유전자의 염기서열 결정
  - 질병저항성 유전자의 역가 측정

9. 원시생식세포 내에 DNA 전이 기술 확립
  - Liposome에 의한 전이
  - Electroporator에 의한 전이
10. 질병저항성 유전자 검증
  - 질병저항성 유전자의 primer 제작
  - Genomic DNA library에서 인터페론, 인터루킨 유전자 screening
  - 인터페론, 인터루킨 유전자 클로닝
  - 인터페론 프로모터, MT 프로모터, SV40 프로모터 등과 발현 벡터 재조합
11. 체외배양 중의 배자에 미세주입법 개발
  - 배자내 미세주입법 개발
12. 재조합된 질병저항성 유전자의 발현검증
  - E. coli로 부터 재조합 인터페론, 인터루킨 정제
  - Cell line으로 부터 재조합 인터페론, 인터루킨 생산
13. 질병저항성 유전자 도입 개체 생산 확인
  - Liposome를 이용하여 전이된 원시생식세포 주입 개체 생산
  - Electroporator를 이용하여 전이된 원시생식세포 주입 개체 생산
  - 체외배양법 이용 유전자 도입 개체 확인
  - 원시생식세포를 이용한 질병 저항성 유전자가 전이된 닭 생산
  - 유전자 미세주입 또는 전이 후 형질전환 닭 생산
14. 유전자 도입 개체의 검증 및 확인
  - 질병저항성 유전자의 개체에 대한 질병저항성 검증
  - 발생된 개체에서 유전자 검증  
(PCR, Southern blotting, Northern blotting)
15. 유전자 도입 개체의 생산 및 개량

- 질병저항성 유전자 도입 개체 자손생산
- 질병저항성 유전자 도입 개체 선발

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

형질전환 닭 생산의 가장 큰 목적은 새로운 품종개량으로 질병저항성 품종의 개량과 실험 동물의 생산 및 생물 반응기를 이용한 유용한 단백질을 생산이 가능할 것이다. 따라서, 유전 공학 기법을 이용한 가속 개량으로 새로운 능력을 갖는 품종의 개량이 촉진된다면 고부가가치를 갖는 종계를 창출할 수 있을 것이며, 또한 질병저항성 유전자와 성장과 연관된 유전자(인터페론과 인터루킨)를 활용함으로써 바이러스성 질병에 대한 항병성을 가지는 신품종을 생산할 수 있을 것이다. 현재 선진국에서는 새로운 항병성이나 성장인자 그리고 생물반응기 생산을 위하여 막대한 연구비를 투자하고 있으며 이에 가시적인 결과가 나온다면 우리는 비싼 사용료를 지불하고 품종을 수입해야 하는 이중의 부담을 가지게 될 것이다. 그러나 국제적 선진기술과 우리의 기술과의 격차가 크지 않으므로 지금부터 좀더 충분한 투자가 선행된다면 우리도 충분한 승산을 가질 수 있다.

#### 1. 질병 저항성 유전자 클로닝 및 특성 분석 완료

##### 1) 질병저항성 유전자 클로닝 성공

- (1) 비장세포 및 T임파구 세포주로부터 인터페론 감마 (Interferon- $\gamma$ ) 클로닝 성공
- (2) 닭의 인터루킨 15 (IL-15) 유전자 클로닝 성공

##### 2) 질병저항성 유전자 특성 분석 완료

- (1) 클로닝된 인터페론 감마와 인터루킨 15의 유전자 특성 및 유전체 특성 분석 완료



(2) 클로닝된 질병저항성 유전자의 발현 단백질에 대한 특성 분석 및  
역가 측정 완료

3) 닭 질병 저항성 유전자의 in vivo 특성 분석 완료

(1) 질병저항성 유전자의 in vivo 발현 벡터 개발 완료

(2) 질병저항성 유전자의 in vivo에서의 발현 및 특성 분석 완료

## 2. 생식선 카이메라의 효율적 생산 성공

1) 원시생식세포 분리 및 단기 체외 배양 성공

(1) 배발달 단계에 따른 원시생식세포 분리 조건 확립

(2) 수용체 배자로의 미세주입기법 확립

(3) 원시생식세포의 단기 체외 배양 조건 확립

2) 원시생식세포내로의 효율적인 유전자 전이 조건 확립

(1) Liposome에 의한 전이 조건 확립

(2) 전기충격법 (Electroporator)에 의한 외래 유전자 전이 조건 확립

(3) 전이된 외래 유전자의 발현 양상 검증 완료

3) 원시생식세포를 이용한 생식선카이메라 생산 성공

(1) 수용체에 안정적 주입 기법 확립

(2) 원시생식기내 원시생식세포의 이동 능력 검증 완료

(3) 원시생식세포의 미세 주입에 의한 실험 축군 확립

4) 형질전환 개체 생산을 위한 연구 진행

(1) 외래 유전자가 도입된 원시생식세포의 이동 및 수용체 배자내 분  
열 능력 검증 완료

(2) 질병 저항성 유전자 전이 개체 분석

### 3. 체외 배양 시스템 개발 및 활용

#### 1) 체외 배양 시스템 개발 완료

- (1) 체외 배양시 환경 조건 조성
- (2) 체외 배양액 개발
- (3) 1세포기 수정란 적출 시술법 개발
- (4) 대리난각공급을 위한 대량 멸균체제 확립

#### 2) 체외 배양 시스템의 최적화

- (1) 체외 배양시 환경 조건 최적화

#### 3) 체외 배양 시스템을 이용한 배자 미세 주입 조건 확립

- (1) 체외배양 중의 배자에 미세주입법 개발

#### 4) 체외 배양 시스템을 이용한 레트로 바이러스 전이 조건 확립

- (1) 체외배양 중의 배자에 레트로 바이러스 전이 조건 확립

## SUMMARY

In poultry industry, bacterial or viral infection disease has been causing the untold economic losses. However, only vaccine programs and use of antibiotics were treated to prevent these disease. Thus, the cost for curing and preventing the disease imposes a heavy burden on poultry farmers and it makes the national competitiveness weaken. In the near future, using up-to-date technology for improvement and introgression of the economic traits will be inevitable for agriculture. To date, since substantial technologies such as genetic manipulation and management of pluripotent cells have currently much room to be improved in aves, practical application of the transgenic system was still limited. Recently, primordial germ cells have been utilized for inducing germline transmission for avian transgenesis and subsequent finding showed that the embryonic gonad is the most favorable site to collect large number of primordial germ cells. Thus, we intended to establish the efficient production system of germline chimera using primordial germ cells and transgenic chicken carrying disease resistance-related gene for improving immune system.

This research was conducted with three big topics; 1) Cloning of disease resistance-related genes in chicken and characterization by using *in vitro* and *in vivo* test, 2) Development of effective production system for germline chimeras using primordial germ cells and application of this system to transgenesis in chicken, and 3) Development and optimization of surrogate system for *in vitro* manipulation of fertilized eggs as follow,

1. Cloning and characterization of disease resistant genes
  - 1) Cloning of chicken disease resistant genes
    - ; successful cloning of chicken interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-15 (IL-15) gene from chicken spleen and T lymphocytes
  - 2) Characterization of chicken disease resistant genes
    - ; analysis and characterization of cloned disease resistant genes and titering of chicken disease resistant gene products for their function
  - 3) *In vivo* test of chicken disease resistant genes
    - ; development of expression vectors carrying disease resistant genes for transgenesis and preliminary *in vivo* expression test of constructed vectors
  
2. Development of effective germline chimeras production system
  - 1) Isolation and short-term *in vitro* culture of primordial germ cells
    - ; optimization of isolation methods from different developmental stages and injection system into recipient embryo.
    - development of short-term culture system for primordial germ cells
  - 2) Defining effective transfection conditions of foreign gene into primordial germ cells
    - ; defining transfection methods using liposome or electroporator and analysis of foreign gene expression
  - 3) Production of germline chimeras using primordial germ cells

- ; development and optimization of injection system into recipient embryo and test of the migration capacity of gonadal primordial germ cells
    - making up stocks by using injection of primordial germ cells and performing progeny tests
  - 4) Production of transgenic chickens
    - ; analysis of foreign gene in produced donor-derived progeny by using PCR and Southern blotting
3. Development of surrogate system
- 1) Development of surrogate system
    - ; development and optimization of surrogate system and additives for the manipulation of embryos at stage X or single cell stage
    - establishment of sterilization system for surrogate system
  - 2) Gene transfer using retroviral vector system
    - ; construction and titering check retroviral vector and application into embryos for transgenesis

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	16
1. Objectives and Significances .....	16
2. Contents and Scope .....	18
Chapter 2. Cloning and characterization of disease resistant genes .....	24
1. Cloning of chicken disease resistant genes .....	24
1) Cloning of chicken interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) gene .....	24
2) Cloning of chicken interleukin-15 (IL-15) gene .....	25
2. Characterization of chicken disease resistant genes .....	30
1) Characterization of chicken disease resistant genes .....	30
2) Titering of chicken disease resistant gene products .....	36
3. <i>In vivo</i> test of chicken disease resistant genes .....	49
1) Development of expression vectors for disease resistant genes .....	49
2) <i>In vivo</i> expression analysis of chicken disease resistant genes .....	49
Chapter 3. Effective production of germline chimeras .....	54
1. Isolation and <i>in vitro</i> culture of primordial germ cells .....	54
1) Isolation from different developmental stages .....	54
2) Development of injection system into recipient embryo .....	62
3) Development of short-term culture for primordial germ cells ..	64
2. Effective transfection of foreign gene into primordial germ cells .....	69
1) Transfer using liposome .....	69
2) Transfer using electroporator .....	73
3) Analysis of foreign gene expression .....	74

3. Production of germline chimeras using primordial germ cells .....	75
1) Development of injection system into recipient embryo .....	75
2) Test of migration capacity of gonadal primordial germ cells ...	80
3) Making up stocks by using injection of primordial germ cells	82
4. Studies on the production of transgenic chickens .....	88
1) Test of migration activity and differentiation capacity of gonadal primordial germ cells after transfection .....	88
2) production of transgenic chicken carrying foreign gene .....	88
 Chapter 4. Development of surrogate system .....	101
1. Development of surrogate system .....	101
1) Optimization of surrogate system .....	101
2) Development of additives for surrogate system .....	102
3) Isolation of single fertilized egg from uterus .....	102
4) Development of sterilization system for surrogate system .....	102
2. Optimization of surrogate system .....	104
1) Optimization of surrogate environments and conditions .....	104
3. Development of injection system into embryo in surrogate egg	106
1) Development of injection system into embryo in surrogate ....	106
4. Gene transfer using retroviral vector system .....	116
1) Gene transfer using retroviral vector system .....	116

## 목 차

제 1 장 서 론 .....	16
제1절 연구 개발의 목적 및 중요성과 범위 .....	16
1. 연구 개발의 배경 및 목적 .....	16
2. 연구 개발의 목적 및 범위 .....	18
제 2 장 질병 저항성 유전자 클로닝 및 특성 분석 .....	24
제1절 질병저항성 유전자 클로닝 .....	24
1. 비장세포 및 T임파구 세포주로부터 인터페론 감마 (Interferon- $\gamma$ ) 클로닝 .....	24
2. 닭의 인터루킨 15 (IL-15) 유전자 클로닝 .....	25
제2절 질병저항성 유전자 특성 분석 .....	30
1. 질병저항성 유전자 특성 분석 .....	30
2. 질병저항성 유전자 발현 단백질 역가 측정 .....	36
제3절 닭 질병 저항성 유전자의 in vivo 특성 분석 .....	49
1. 질병저항성 유전자의 in vivo 발현 벡터 개발 .....	49
2. 질병저항성 유전자의 in vivo 발현 특성 분석 .....	49
제 3 장 생식선 카메라의 효율적 생산에 관한 연구 .....	54
제1절 원시생식세포 분리 및 단기 체외 배양 .....	54
1. 배발달 단계에 따른 원시생식세포 분리 조건 확립 .....	54
2. 수용체 배자로의 미세주입기법 확립 .....	62
3. 원시생식세포의 단기 체외 배양 조건 확립 .....	64
제2절 원시생식세포내로의 효율적인 유전자 전이 .....	69
1. liposome에 의한 전이 .....	69



2. 전기충격법 (Electroporator)에 의한 외래 유전자 전이 .....	73
3. 전이된 외래 유전자의 발현 양상 검증 .....	74
제3절 원시생식세포를 이용한 생식선카이메라 생산 .....	75
1. 수용체에 안정적 주입 기법 확립 .....	75
2. 원시생식기내 원시생식세포의 이동 능력 검증 .....	80
3. 원시생식세포의 미세 주입에 의한 실험 축군 확립 .....	82
제4절 형질전환 개체 생산을 위한 연구 .....	88
1. 외래 유전자가 도입된 원시생식세포의 이동 및 수용체 배자내 분열 능력 검증 .....	88
2. 질병 저항성 유전자 전이 개체 생산 .....	88
제 4 장 체외 배양 시스템 개발 및 활용 .....	101
제1절 체외 배양 시스템 개발 .....	101
1. 체외 배양시 환경 조성 .....	101
2. 체외 배양액 개발 .....	102
3. 1세포기 수정란 적출 기술법 개발 .....	102
4. 대리난각공급을 위한 대량 멸균체제 확립 .....	102
제2절 체외 배양 시스템의 최적화 .....	104
1. 체외 배양시 환경 조성 .....	104
제3절 체외 배양 시스템을 이용한 배자 미세 주입 .....	106
1. 체외배양 중의 배자에 미세주입법 개발 .....	106
제4절 체외 배양 시스템을 이용한 레트로 바이러스 전이 .....	116
1. 체외배양 중의 배자에 레트로 바이러스 전이 .....	116

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구 개발의 목적 및 중요성과 범위

### 1. 연구 개발의 배경 및 목적

#### 가. 기술적 측면

유전공학기술, 세포발생공학 기술 그리고 여러 첨단과학 기술이 응집되어 형질전환 동물의 생산이 가능하게 되었다. 형질전환 동물의 생산은 마우스등에서는 많은 성과를 거두고 있으며 질환모델과 관련하여 특정 질병 유전자가 발현되거나 아니면 저항성 유전자를 도입하여 형질저항성을 증가시키는 형태의 연구들이 진행되고 있다. 또한 이러한 실험동물에서의 성과를 대동물에 적용시키려는 시도들이 이루어지고 있으나, 아직은 미진한 상태이다. 닭은 형태학적, 발생학적 차이 때문에 포유류와 같이 수정란에 의해 유전자를 미세주입하는 방법은 어렵다. 마우스 및 돼지에서 질병 저항성 유전자를 이용한 형질전환 동물의 생산은 보고가 되었으나, 마우스를 제외하고는 뚜렷한 결과가 없는 상황이다. 그렇지만 매년 질병이나 항생제 및 치료제가 전체 생산비에 차지하는 비중이 자꾸 높아지는 상황에서 닭 생산 산업에 있어서는 이러한 부분이 무엇보다도 중요한 문제로 부각되고 있다. 이러한 이유 때문에 유전 공학적 기법을 도입한 인테페론과 인터루킨 유전자와 같은 질병 저항성 유전자를 가지는 형질전환 닭이 생산되어 이것이 실제 농가에 보급되고 가금 개량에 응용된다면, 막대한 시간과 비용을 절감할 수 있으며 기존의 재래적인 개량 방법을 획기적으로 발전시킬 수 있을 것이다.

#### 나. 경제·사회적 측면

현재 닭의 경우는 질병에 무방비 상태이고 병아리에서 고기로 출하되기

직전까지 백신이나 치료제 또는 항생제에 의존하여 질병을 예방한다고 해도 무리는 아니다. 부화하자마자 마텍이나 전염성 기관지염 백신에서 산란계의 경우는 산란 저하 증후군에 이르는 기본적 질병 예방 백신이 10여가지에 이르고 있어 이에 의한 백신 비용이나 항생제에 드는 비용 때문에 의하여 생산비 증가로 인한 경쟁력의 악화가 큰 문제가 되고 있으며 이에 대한 뚜렷한 대책도 없는 실정이다. 따라서 질병 저항성 유전자 도입 기법에 의해 한 계통의 종계를 만들었을 경우 예상되는 시장은 1000억원 이상이 될 것으로 기대되며 이로 인한 막대한 외화 대치 효과도 예상된다. 또한 대부분의 백신이나 치료 약이 대부분 수입에 의존하고 있어 이에 따르는 외화 손실 및 항생제 등의 잔류 문제로 국가경제 및 국민 건강 축진의 측면에서 상당한 손실이 아닐 수 없다. 따라서 질병 저항성 유전자 도입 닭의 생산 시스템 및 생산의 확립이 요구되며 이에 대한 육성 정책이 시급하다.

#### 다. 산업적 측면

앞으로의 국제 사회에서 최고의 기술과 경제적 부가가치 창출에 의한 효율적인 생산 체계를 통한 산업적 이용에 응용할 수 있는 기술만이 살아남을 수 있다. 이러한기 때문에 영토가 적고 자원이 좁은 우리로서는 이러한 첨단 유전 공학적 기법을 이용한 질병 저항성 가축을 생산해 내면서 생산 비용 절감 및 이를 기반으로 1차산업에서 첨단 산업으로의 변화를 가져야만 밀려오는 저가의 육류 생산품에 비교 가격 경쟁력을 유지하면서 산업구조의 안정화를 도모할 수 있을 것이다.

#### 라. 앞으로 전망

형질전환 닭 생산의 가장 큰 목적은 새로운 품종개발으로 생물 반응기를

이용한 유용한 단백질을 생산하는 기술, 질병저항성 품종의 개량과 실험 동물의 생산 등을 이야기 할 수 있다. 만일 외래 유전자를 손쉽게 생체 내의 유전체내로 전이하여 우리가 원하는 방향으로 유전자를 조작할 수 있다면 이러한 모든 문제를 손쉽게 해결될 수 있을 것이다. 그리고 유전 공학 기법을 가축 개량에 도입하여 새로운 능력을 갖는 품종의 개량이 촉진된다면 고부가가치를 갖는 종계를 창출 할 수 있을 것이며, 또한 질병저항성 유전자와 성장과 연관된 유전자 (인터페론과 인터루킨)를 활용함으로써 바이러스성 질병에 대한 항병성을 가지는 신품종을 생산할 수 있을 것이다. 국내에는 현재 실험동물 단계에서 쥐를 이용한 형질전환 동물 생산과 생명공학연구소에서 형질전환 젖소에 관한 연구가 진행되고 있으며, 닭의 경우는 본 연구실에서 생식선 카이메라 생산에 성공하였으며 현재 유전자 전이 확인 실험을 하고 있다. 서구 구미의 경우 현재 새로운 항병성이나 성장인자 그리고 생물반응기 생산을 위하여 막대한 연구비를 투자하고 있으며 이에 가시적인 결과가 나온다면 우리는 비싼 사용료를 지불하고 품종을 수입해야 하는 이중의 부담을 가지게 될 것이다. 그러나 국제적 선진기술과 우리의 기술과의 격차가 크지 않으므로 지금부터 충분한 투자가 선행된다면 우리도 충분한 승산을 가질 수 있다.

## 2. 연구 개발의 목적 및 범위

### 가. 연구 개발의 목적

본 연구의 목적은 가금, 특히 닭으로부터 질병 저항성 유전자를 클로닝하여 유전체 구조 및 생물학적 특성 구명을 하며, 클로닝된 질병 저항성을 이용한 형질전환 닭을 생산하는데 있다. 또한, 형질전환 닭 생산을 위하여 원시생식세포 및 체외배양법을 이용하여 최적의 조건을 확립하며, 외래 유전자의 유전체내 안정적인 삽입을 위한 레트로바이러스 벡터의 이용 가능성을 타진하는데도 그 목적이 있다.

## 나. 연구 개발의 범위

### 1) 연차별 연구 개발 목표 및 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1996-1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷초기 발생시기별 원시생식세포의 분리방법 확립</li> <li>▷혈관내 미세 주입법 개발</li> <li>▷체외 배양 시스템 조성</li> <li>▷질병저항성 유전자 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○GC로부터 원시생식세포 분리</li> <li>○혈관으로부터 원시생식세포 분리</li> <li>○gonad로부터 원시생식세포 분리</li> <li>○배발달 과정중 혈관내 미세주입법 개발</li> <li>○체외 배양시설 환경 조성</li> <li>○수정란 생산 공급 체계 확립</li> <li>○체외 배양액 개발</li> <li>○대리난자 공급을 위한 대량멸균체계 확립</li> <li>○초기배 물리적 조작의 발생영향 검토</li> <li>○ PCR에 의한 질병저항성 유전자 클로닝</li> <li>○ 닭 T-cell cDNA library screening</li> </ul>
2차년도 (1997-1998)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷원시생식세포의 배양조건 확립</li> <li>▷원시생식세포 이용 생식선키메라 생산 체계 확립</li> <li>▷대리난자 배양법 개발 (In vitro culture) 에 의한 개체 생산</li> <li>▷질병저항성 유전자 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○최적의 배양액 조성 확립</li> <li>○PKH2, PKH26등의 염색에 의한 원시생식세포 분열 확인</li> <li>○GC, 혈관계, gonad의 원시생식세포별 배양 성적 비교</li> <li>○수용체에 안정적 주입 기법 확립</li> <li>○후대검정에 의한 키메라율 검증</li> <li>○생식선 키메라 안정적 생산</li> <li>○체외배양법에 의한 개체의 안정적 생산</li> <li>○질병저항성 유전자의 염기서열 결정</li> <li>○질병저항성 유전자의 역가 측정</li> </ul>

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
3차년도 (1998-1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷원시생식세포 내에 DNA 전이 기술 확립</li> <li>▷질병저항성 유전자 검증</li> <li>▷체외배양 중의 배자에 미세주입법 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○Liposome에 의한 전이</li> <li>○Electroporator에 의한 전이</li> <li>○질병저항성 유전자의 primer 제작</li> <li>○Genomic DNA library에서 인터페론, 인터루킨 유전자 screening</li> <li>○인터페론, 인터루킨 유전자 클로닝</li> <li>○인터페론 프로모터, metallothionein 프로모터, SV40 프로모터등과 발현 벡터 재조합</li> <li>○배자내 미세주입법 개발</li> </ul>
4차년도 (1999-2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷재조합된 질병저항성 유전자의 발현검증</li> <li>▷질병저항성 유전자 도입 개체 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원시생식세포 이용</li> <li>- 체외배양법 이용</li> </ul> </li> <li>▷질병 저항성 유전자 도입 개체 생산 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원시생식세포 이용</li> <li>- 체외배양법 이용</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○E. coli로 부터 재조합 인터페론, 인터루킨 정제</li> <li>○Cell line으로 부터 재조합 인터페론, 인터루킨 생산</li> <li>○Chick cell line에서 인터페론, 인터루킨 titration</li> <li>○클로닝된 질병저항성 유전자 (IL-15, IFN-<math>\gamma</math>)에 대한 질병저항성 검증</li> <li>○Liposome를 이용하여 전이된 원시생식세포 주입 개체 생산</li> <li>○Electroporator를 이용하여 전이된 원시생식세포 주입 개체 생산</li> <li>○체외배양법 이용 유전자 도입 개체 확인</li> <li>○원시생식세포를 이용한 질병 저항성 유전자가 전이된 닭 생산</li> <li>○유전자 미세주입 또는 전이 후 형질전환 닭 생산</li> </ul>

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
5차년도 (2000 -2001)	▷유전자 도입 개체의 검증 및 확인	○질병저항성 유전자의 개체에 대한 질병저항성 검증 ○발생된 개체에서 유전자 검증 (PCR, Southern blotting, Northern blotting)
	▷유전자 도입 개체의 생산 및 개량	○질병저항성 유전자 도입 개체 자손생산 ○질병저항성 유전자 도입 개체 선발

## 2) 연구 내용 및 범위

### 가) 체외 배양 시스템

- 수정란의 다양한 체외 배양시설 환경확립 및 비교
- 수정란의 다양한 체외 배양액 개발
- 미세주입법 개발

### 나) 원시생식세포의 순수분리

- germinal crescent로부터 원시생식세포 분리
- 혈액으로부터 원시생식세포 분리
- 5일령 gonad로부터 원시생식세포 분리
- 피콜(Ficoll)에 의한 원시생식세포의 순수 분리기법 확립
- PAS등의 염색에 의한 원시생식세포의 확인

### 다) 원시생식세포의 배양법 확립

- 최적 세포배양액 조성 확립
- PHK2, PKH26등의 염색에 의한 세포분열 확인
- Germinal crescent, 혈관, gonad의 원시생식세포별 배양
- Germinal crescent, 혈관, gonad의 원시생식세포별 배양 조건 비교
- 기저 세포(Stroma cell)에 의한 배양법 확립

라) 생식선 카이메라 생산

- 생식선 카이메라 개체 검정기법 확립
- 원시생식세포 주입에 의한 생식선 카이메라 생산

마) 질병 저항성 유전자인 확보

- PCR 기법을 이용하여 질병저항성 유전자클로닝
- 닭 T-cell cDNA library로부터 screening 및 염기서열 결정
- 클로닝된 질병저항성 유전자의 역가측정

바) 재조합 유전자 개발

- 질병저항성 유전자에 대한 primer제작
- genomic DNA library에서 질병저항성 유전자 screening.
- PCR product를 벡터에 클로닝
- 인터페론 유전자 프로모터, metallothionein 프로모터, SV40 프로모터등과 재조합

사) 재조합된 질병저항성 유전자의 발현 검증

- E. coli로부터 재조합된 인터페론, 인터루킨 정제
- cell line로 부터 재조합된 인터페론, 인터루킨 생산
- 닭의 cell line로 부터 인터페론, 인터루킨 titration
- Virus성 질병에 대한 *in vivo* 인터페론, 인터루킨 역가 측정

아) 질병저항성 유전자 도입 개체 생산.

- 원시생식세포에 liposome 또는 electroporator로 유전자 전이  
(electroporator 사용시 다양한 전압조건으로 안정된 유전자 도입 기술 확립)



- 원시생식세포 벡터 시스템 확립
- 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전이  
(생산개체에 대한 안정성 검증)
- 체외배양법에 의한 유전자 미세주입

자) 질병저항성 유전자 검증.

- 발생된 개체 유전자 검증(PCR, Southern, Western blotting 등)
- 질병에 대한 저항성 검증
- 질병저항성 관련 probe 제작
- 질병 저항성 유전자 전이 개체 자손 생산
- 유전자 전이 개체 선발

## 제 2 장 질병 저항성 유전자 클로닝 및 특성 분석

본 장에서는 닭의 질병저항성 관련 유전자의 클로닝 및 이에 대한 특성과 역가 분석에 대한 실험을 수행하였다. 본 연구는 닭의 질병 저항성 유전자를 새롭게 발굴하고, 이에 대한 특성 분석을 하고자 하였다. 또한 형질전환 개체 생산을 위하여 기존에 보고되어진 유전자를 사용하지 않고 새로운 관련 유전자를 클로닝하여 사용함으로써 유전자 사용에 대한 소유권 문제를 제거하고자 하였다. 본 연구는 미농무성 (USDA) 닭 질병면역연구실의 Lillehoj 박사팀과 공동 연구를 수행하였다.

### 제1절 질병저항성 유전자 클로닝

#### 1. 비장세포 및 T임파구 세포주로부터 인터페론 감마 (Interferon- $\gamma$ ) 클로닝

닭의 질병 저항성 유전자 중의 하나인 인터페론 감마 (Interferon- $\gamma$ )를 클로닝하기 위해 8-10주령된 화이트 레그혼으로부터 말초 혈액 임파구와 비장세포를 분리한 다음 RPMI-1640 (10% FCS) 배지에 Concanavalin-A (Con-A)를 처리하여 임파구들을 활성화 시켰다. 배양이 끝난 다음, guanidium-acid-phenol법을 이용하여 total RNA를 추출하였으며 mRNA는 oligo(dT) bead를 이용하여 분리하였다. Figure 1은 세포 배양후 추출한 total RNA를 나타내는 그림으로 28S와 16S RNA가 확연히 보여서 이후 RT-PCR을 비롯한 RNA 분석에 적합하였다. 닭의 인터페론 감마 유전자를 클로닝하기 위해 유전자의 단백질 코딩 부위에 해당하는 부위를 증폭하기 위해 여러 쌍의 primer를 작성하여 RT-PCR을 실시하였다 (Table 1).

이들 중 forward primer로 F1 (5'-GGG AAT TCA AGA AGA TGA CTT GCC AGA CTT ACA AC-3')을 reverse primer로 R1 (5'-TTT CTA GAT TAG CAA TTG CAT CTC CTC TGA GAC TG-3')으로 PCR을 실시하였을 때 가장 좋은 PCR 조건을 확립할 수 있었다. 그리고 이들 prime들은 각각 *Eco RI*, *Xba I* 제한 효소 부위를 가지고 있어 방향성을 가진 클로닝이 가능하였다. RT-PCR을 실시하기 위해 1 $\mu$ g의 total RNA를 reverse transcription 반응을 통해 cDNA로 만든 다음 제작된 primer로 PCR을 실시하였다. Figure 2는 Con-A에 의해 활성화된 비장 임파구와 말초 혈액 임파구에서 RT-PCR을 통해 증폭한 닭 인터페론 감마 유전자를 보여 준다. 증폭된 유전자의 크기는 517bp이었다. RT-PCR 산물을 여러 종의 제한 효소로 절단하여 분석한 결과는 Figure 3에 제시되어 있다.

## 2. 닭의 인터루킨 15 (IL-15) 유전자 클로닝

닭에서 질병 저항성 유전자 (IL-15)를 클로닝하기 위해 forward primer로 5'-GGG AAT TCA CTG CCA TGA TGT GCA AAG TA-3'을 reverse primer로 5'-TTT CTA GAT TAT TTT TGC AGA TAT CTC AC-3'을 합성하였다. RT-PCR을 실시하기 위해 닭 splenocyte와 말초 혈액으로부터 임파구를 분리한 다음, polyclonal activator인 Con-A로 활성화시켰다. 활성화된 세포로부터 total RNA를 추출하였고, total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다 (Figure 4). PCR 산물을 *Eco RI*과 *Xba I*으로 절단한 다음 *Eco RI*과 *Xba I*으로 절단된 pUC19에 클로닝하였다. 얻어진 재조합 클론들을 다시 *Eco RI*과 *Xba I*으로 절단하여 클로닝 여부를 결정하였다 (Figure 5).

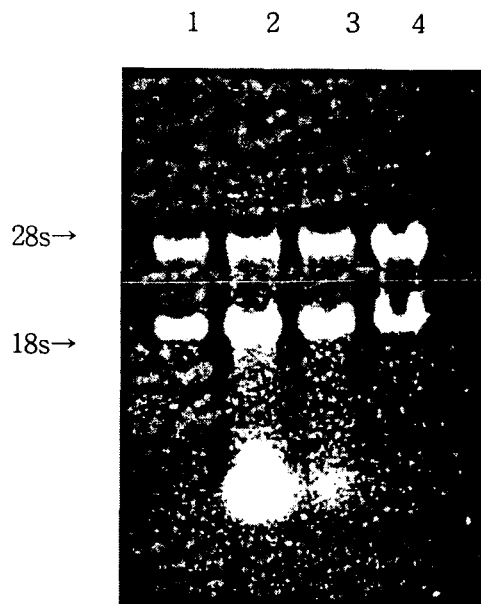


Figure 1. Denaturing gel electrophoresis of total RNAs. lane 1 : spleen lymphocytes (No Con-A activated), 2 : Con-A activated spleen lymphocytes (SPL), 3 : Con-A activated peripheral blood lymphocytes (PBL), 4 : T-cell line.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR of chicken interferon- $\gamma$ .

Primer	Sequences
F1	5'-GGG AAT TCA AGA TGA CTT GCC AGA CTT ACA AC-3'
R1	5'-TTT CTA GAT TAG CAA TTG CAT CTC CTC TGA GAC TG -3'
F2	5'-AGT CAT TCA GAT GTA GCT GAC GGT GGA C-3'
R2	5'-GGC TTT GCG CTG GAT TCT CAA GTC-3'
F3	5'-GAA GCT ATC TGA GCA TTT GAA CTG AGC-3'
R3	5'-GTT GAG CAC AGG AGG TCA TAA GAT-3'
F4	5'-AGG ATC ATA CTG AGC CAG-3'
R4	5'-CAG AGT ATA GAG CTC CTC-3'



Figure 2. RT-PCR of chicken interferon-gamma cDNA. lane 1 : Size marker, 2 : Con-A activated SPL and PBL, 3 : Con-A activated SPL, 4 : Con-A activated PBL.

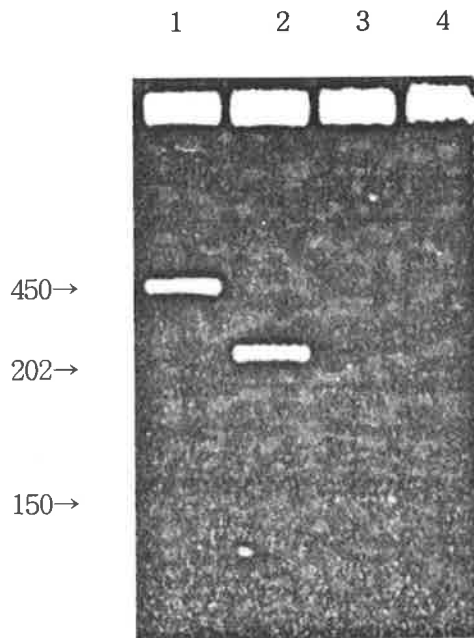


Figure 3. Restriction enzyme mapping of chicken interferon-gamma cDNA. lane 1 : Size marker, 2 : Hae III/Eco RI. 3 : Sst I/Xba I, 4 : EcoRI/Xba I.

## 제2절 질병저항성 유전자 특성 분석

### 1. 질병저항성 유전자 특성 분석

#### 가. 닭 인터페론 감마 유전자 특성 분석

##### 1) 닭 인터페론 감마 유전자의 염기서열 분석 및 발현 양상 분석

RT-PCR을 통해 얻어진 PCR 산물을 일반적인 클로닝 벡터인 pUC18에 클로닝하였고, PCR 반응에 이용한 primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. Figure 2에서 나타난 DNA 조각에 해당하는 염기서열이 닭 인터페론 감마 염기서열 안에 존재하고 있다. 또, 염기서열을 아미노산 서열로 해독한 결과를 보면, 기존에 밝혀진 아미노산 서열과 일치함을 알수 있다. 또, 닭의 비장세포를 Con-A로 활성화 시켰을 때, Con-A에 의한 RNA 발현 양상을 Northern blot과 RT-PCR로 조사하였다 (Figure 6). 닭 인터페론 감마는 Con-A에 의해 전사 단계에서 조절되며, Con-A 처리 후 약 2시간 부터 4시간 사이에 최대 발현을 보이고 이후 감소하는 양상을 보였다.

##### 2) 닭 인터페론 감마 유전자의 genomic 구조 분석

닭 질병 저항성 유전자인 인터페론 감마의 유전자 구조를 밝히기 위해 닭의 genomic library를 screening하여 유전자를 클로닝하였다. Figure 7은 genomic library screening 결과를 보여준다. 약 700,000 개의 plaque를 screening하여 전체 10개의 positive clone들을 얻었으며 이중 인터페론 감마의 genomic clone들 중에서 하나를 선택하여 제한효소 지도 및 subcloning을 실시하고 있다. 제한효소 지도 작성을 위하여 파아지 (phage)의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 *Eco RI*, *Bam HI*, *Sal I*, *Sac I*, *Not I* 등 클로닝 벡터에 인지부위가 존재하는 제한효소들을 이용하여 완전 절단하였다. 절단된 DNA를 0.8% 아가로즈 겔에서 크기별로 분리하고, 나일론 멤브레인에 모세관 현상을 이용한 Southern blotting방법을 이용하여



옮겼다. DNA 절편이 옮겨진 나일론 멤브레인을 UV-crosslinker를 이용하여 완전 결합시켰다. 닭 인터페론 감마 cDNA를 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP를 사용하여 random priming 방법으로 hybridization용 probe를 준비하였다. 나일론 멤브레인을 온도 42°C에서 prehybridization solution (6X SSC, 5X Denhardt's solution, 50% deionized formamide, 100 $\mu$ g/ml denatured calf thymus DNA)에 2시간 배양한 후, 방사성 동위원소로 표지된 hybridization을 실시하였다. 16시간 hybridization후 상온에서 washing solution (2X SSC, 0.1% SDS)으로 2번 세척한 후, 65°C에서 0.1X SSC 0.1% SDS로 1시간동안 2번 세척을 실시하였다. 세척이 끝난 후, X-ray 필름에서 감광시켰다. Southern hybridization을 통해 대략적인 제한효소 지도를 작성하였으며, 이를 이용하여 subcloning을 실시하였다.

Figure 8은 닭 인터페론 감마 cDNA를 프로브로 이용하여 분리한 genomic clone 중의 하나인  $\lambda$  chIFN-3을 분석한 결과이다. 박테리오파지 DNA를 분리하여 *Eco* RI, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Sal* I으로 절단하여 0.8% 아가로스 젤상에서 분획하고 (Figure 8A) Southern hybridization을 실시하였다 (Figure 8B). 이 중에서 *Eco* RI으로 절단하였을 때 나온 밴드들을 pUC19 클로닝 벡터에 서브클로닝하였다. Figure 9는 서브클로닝된 클론들을 *Eco* RI, *Hind* III, *Eco* RI/*Hind* III를 이용하여 절단하여 클로닝된 DNA단편의 크기를 확인한 것이다. DNA 단편의 순서를 결정하기 위해  $\lambda$ chIFN-3을 *Eco* RI과 *Hind* III로 부분 절단하여 DNA 단편을 분석하여 제한효소 지도를 작성하였다. Figure 10은  $\lambda$  chIFN-3의 제한효소 지도를 보여주고 있다.

1 2 3 4 5 6 7

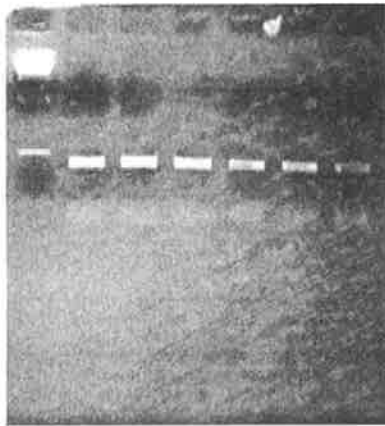


Figure 4. RT-PCR of chicken IL-15 cDNA. lane 1 :  $\lambda$ -*Hind* III, lane 2: SPL 0h, lane 3: SPL 4h, lane 4 : SPL 7h, lane 5: SPL 16h, lane 6: PBL 4h, lane 7: PBL 7h

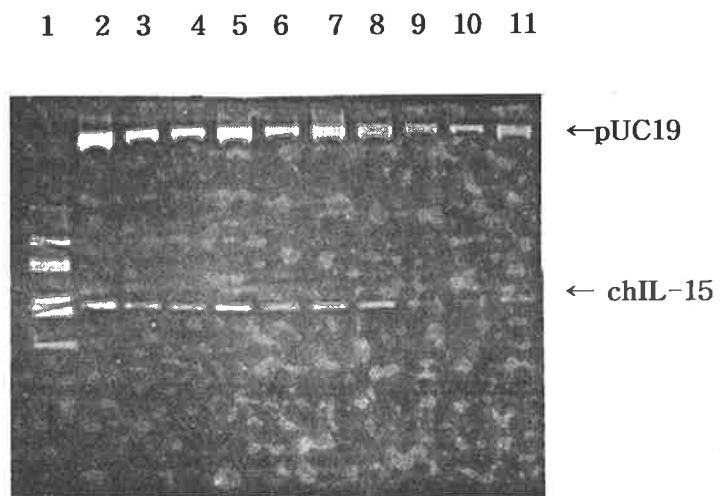


Figure 5. Restriction digestion of plasmid having chicken IL-15 cDNA. Plasmids were digested with *Eco RI* and *Xba I* and separated in 2% metaphore agarose gel. lane 1: pUC18-*Hae III*, lane 2-11: pUC-chIL-15 #1-10

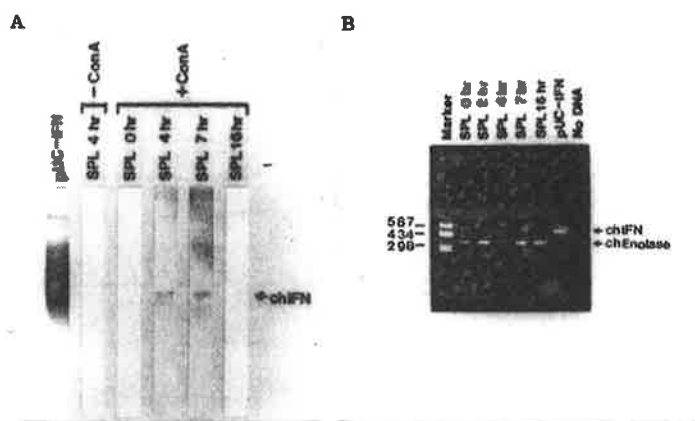


Figure 6. RNA analysis of chicken interferon-gamma during Con-A activation.

- A. Northern blot lane 1 : SPL (No Con A), 2 : SPL 0 h, 3 : SPL 2 h, 4 : SPL 4 h, 5 : SPL 7 h, 6 : SPL 16 h
- B. RT-PCR lane 1 : SPL (No Con A), 2 : SPL 0 h, 3 : SPL 2 h, 4 : SPL 4 h, 5 : SPL 7 h, 6 : SPL 16 h

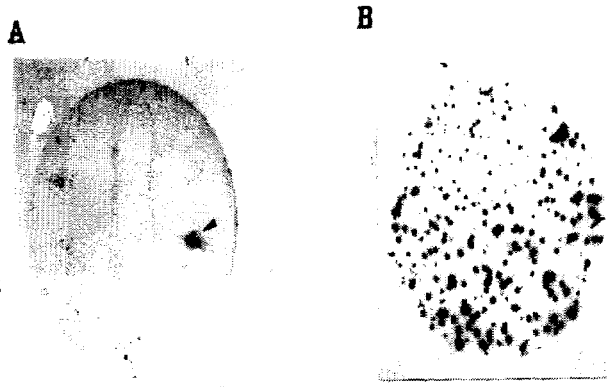


Figure 7. Results of genomic library screening.

A : First screening, B : Second screening

## 나. 닭 인터루킨 15 유전자 특성 분석

닭 인터루킨 15 (chicken IL-15)의 완전한 염기서열 분석 및 단백질 아미노산 서열을 밝혀냈다 (Figure 11). Library insert size는 0.8kb였으며 poly(A) tail을 포함한 염기서열은 700bp였다. 또한 open reading frame은 429bp였으며, 143 아미노산으로 구성되었다. Swissprot database에 의한 염기서열 유사도 추정은 Figure 11B에 도식화하였다. 아미노산 염기서열 중 signal sequence는 Figure 11B에 화살표로 표시하였으며, 절단 후 전체 아미노산은 123개였다. 그러나 유사한 분자량과는 달리 포유류와의 염기서열의 유사도는 전체적으로 그리 높지 않았다. 가장 유사한 종은 소로써 31%의 정확도와 43%의 유사도를 나타내었다. 이러한 결과는 사람과 마우스의 경우, 73% 아미노산 정확도에 비하여 상당히 유사도가 낮은 결과로 생각된다. 그러나 IL-15의 생물학적 기능에 가장 중요한 4개의 시스테인은 닭의 경우에도 보존되어 있었다 (Fig. 11B).

## 2. 질병저항성 유전자 발현 단백질 역가 측정

### 가. 닭 인터페론 감마 단백질 생산 및 역가 측정

RT-PCR에 의해 CD4<sup>+</sup> T-cell로부터 클로닝한 질병 저항성 유전자의 하나인 닭 인터페론 감마를 각각 박테리아 발현 벡터인 pMAL-c와 동물세포 발현 벡터인 pcDNA3에 옮겨서 *Escherichia coli* (*E. coli*), COS cell line, CEC-32 fibroblast cell line에서 발현시켰다. 발현된 재조합 인터페론 감마의 *in vitro* 활성을 알아보기 위하여 anti-viral activity와 macrophages (HD11)등의 면역관련 세포의 활성 유도 등을 확인하였다. 재조합 인터페론 감마에 대한 *in vitro* viral neutralization assay를 이용한 anti-viral activity 측정 결과는 Table 2에 제시하였다.

Table 2에서 보면, COS와 CEC-32에서 발현된 재조합 인터페론 감마 경

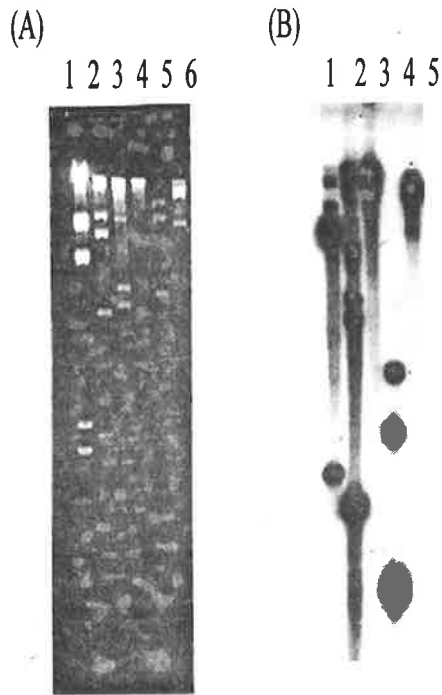


Figure 8. Restriction mapping of  $\lambda$  phages having chicken IFN- $\gamma$  genomic sequences ( $\lambda$ chIFN-3). (A) Restriction digestions with Eco RI (lane 2), Hind III (lane 3), Kpn I (lane 4), Pst I (lane 5) and Sal I (Lane 6). (B) Southern hybridization lane 1: Eco RI, lane 2: Hind III, lane 3: Kpn I, lane 4: Pst I, lane 5: Sal I

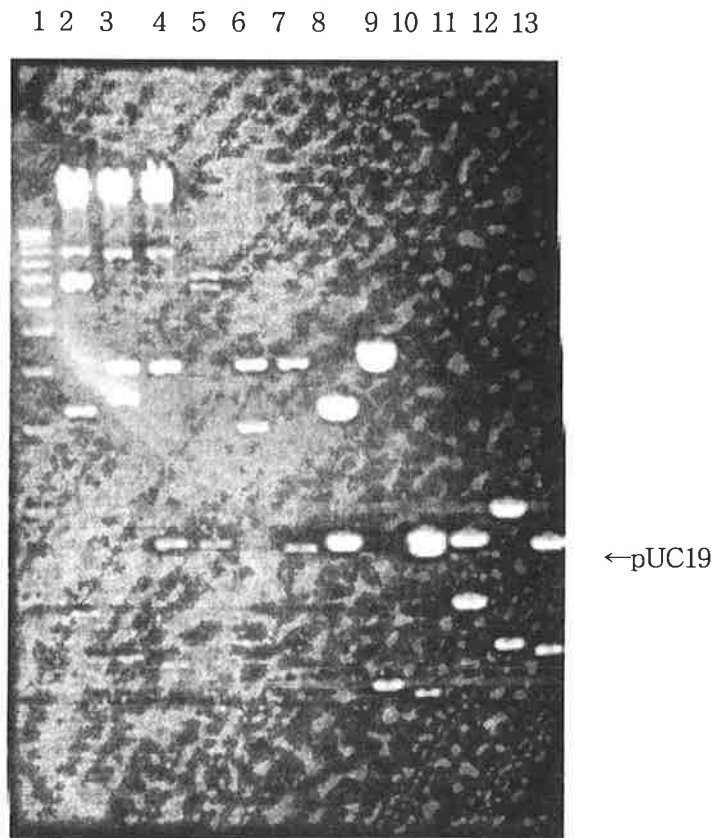


Figure 9. Subcloning of  $\lambda$ chIFN-3 in pUC19 vector. lane 1: 1kb ladder, lane 2:  $\lambda$ chIFN-3 Eco RI, lane 3:  $\lambda$ chIFN-3- Hind III, lane 4: Eco RI/Hind III, lane 5: pUC-chIFN-8 Eco RI, lane 6: pUC-chIFN-8 Hind III, lane 7:pUC-chIFN-8 Eco RI/Hind III, lane 8: pUC-chIFN-4.3 Eco RI, lane 9: pUC-chIFN-4.3 Hind III, lane 10 :pUC-chIFN-4.3 Eco RI/Hind III, lane 11: pUC-chIFN-2.1 Eco RI, lane 12: pUC-chIFN-2.1 Hind III, lane 13:pUC-chIFN-2.1 Eco RI/Hind III



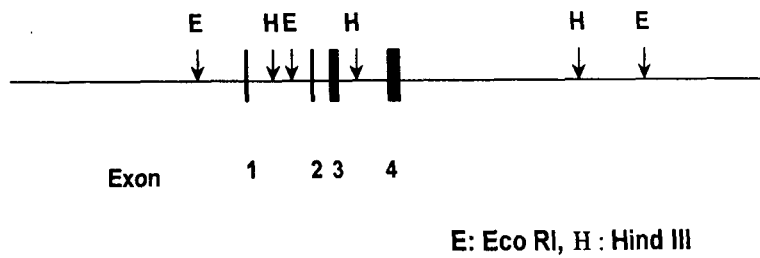


Figure 10. Restriction map and genomic organization of the *chIFN- $\gamma$*  gene. Eco RI (E) and Hind III (H) restriction sites are shown. The bold box indicates the relative positions of exons 1-4.

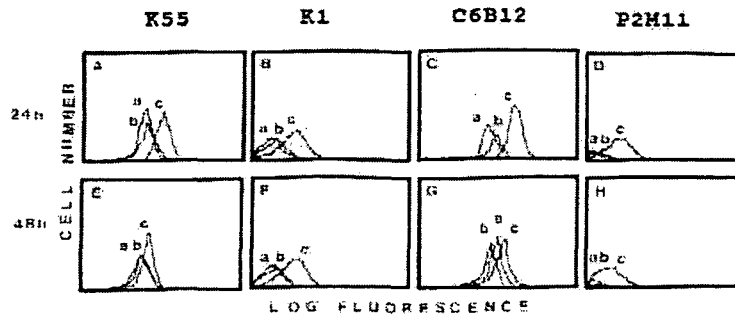


Table 2. Antiviral activities of recombinant cIFN- $\gamma$  produced from four expression vectors

Source of IFN $\gamma$ <sup>a</sup>	IFN titer <sup>b</sup> (Mean $\pm$ SD)
p34 T hybridoma	11 $\pm$ 2
pMAL-IFN in <i>E. coli</i>	1 $\pm$ 1
pCDNA-IFN in COS	7 $\pm$ 2
pCDNA-IFN in CEC-32	11 $\pm$ 1

<sup>a</sup> Chicken CEFs were treated overnight with serially diluted rIFN- $\gamma$  preparations and were infected with predetermined dose of VSV. IFN titers were determined at 48h post VSV infection

<sup>b</sup> Numbers indicate the last dilution in 96-well showing antiviral activity. Average of three independent experiments



	Percent staining			LFI		
	a	b	c	a	b	c
A	100	100	100	4.8	6.8	18.2 *
B	63	79	98 *	0.4	0.5	1.3 *
C	55	86	100 *	7.1	8.4	59.0 *
D	26	28	99 *	0.3	0.4	2.0 *
E	99	96	92	4.1	4.1	6.9 *
F	67	81	91 *	0.4	0.4	2.0 *
G	100	100	100	7.6	9.0	17.6 *
H	3	14	75 *	0.2	0.2	0.6 *

Figure 12. Chicken rIFN- $\gamma$  induced enhancement of cell surface antigen on HD 11 cells. HD 11 cells were pretreated with medium (a), rIFN- $\gamma$  from pMAL-IFN transfected CEC-32 cells (c) for 24 and 48 h. HD 11 cells were stained with K55, K1, C6B12 and P2Mii mAbs detecting pan-lymphocytes, macrophages, class I MHC and class II MHC antigens respectively. Results were analyzed on 10,000 viable lymphocytes. LFI refers to log of the fluorescence intensity. \* indicates significant ( $p < 0.05$ ) changes from medium-treated control.

우 P34 배양 배지의 antiviral activity가 유사하였다. 또한 *E. coli*에서 발현된 재조합 인터페론 감마의 경우 가장 낮은 antiviral activity를 보였다. 또한 macrophage의 세포수준에서의 *in vitro* 검증 결과, COS나 CEC-32 fibroblast cell line으로부터 발현된 재조합 인터페론 감마 $\nu$ 으로 HD11 macrophage를 처리한 경우 class I과 class II antigen의 발현이 증가하였다 ( $p>0.05$ ) (Figure 12).

또한 재조합 인터페론 감마으로 처리하였을 경우 K55 (anti-lymphocyte) 와 K1 (anti-macrophage) 단클론 항체 (monoclonal antibody)에 의한 세포 표면 항원의 발현도 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 재조합 인터페론 감마의 처리는 각 항원에 대한 검색 비율과 평균 형광 발현도 (mean fluorescent intensities ; MFI) 모두를 증가시켰으며, 처리 24시간 후 최고점에 도달하였다. 그러나 *E. coli*로부터 발현된 재조합 인터페론 감마 (pMAL-IFN- $\nu$ )의 경우에는 HD11 macrophage에 대한 세포 표면 항원의 발현 양상에 거의 영향을 주지 않아 antiviral activity 측정과 동일한 결과를 보였다. 또한 재조합 인터페론 감마에 대한 peripheral blood monocyte 영향도 HD 11 macrophage와 거의 동일한 양상을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 T cell로부터 클로닝한 닭의 인터페론 감마의 *in vitro*상에서 면역관련세포 활성을 조절할 수 있음을 알 수 있다.

#### 나. 닭 인터루킨 15 생산 및 특성 분석

클로닝된 질병저항성 유전자인 인터루킨 15 (IL-15)를 *E. coli*로부터 생산하여 특성 분석을 실시하였다. *E. coli*내의 다발현을 위하여 *Eco* RI-*Xba* I에 의해 pUC18과 결합시켜 DH5a에 transformation하여 보존하였다. 발현 벡터는 maltose binding protein (MBP)과 인터루킨 -15가 결합된 형태를 가지며, 분리 정제를 위하여 10mg/ml tryptone, 5mg/ml yeast extract,

5mg/ml NaCl, 2mg/ml glucose, 100 $\mu$ g/ml ampiciline 배지에서 37 $^{\circ}$ C로 OD<sub>600</sub>=0.4 까지 배양 후 0.3mM isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside로 발현 유도를 하였다. 배양된 *E. coli*는 amylose gel affinity chromatography를 이용하여 MBP-IL-15 결합 단백질을 순수 분리하였다. 정제된 MBP-IL-15는 Factor Xa를 처리하여 최종적으로 재조합 인터루킨 -15를 회수하였다. 정제된 MBP-IL-15는 chicken 인터루킨 -15의 77-89 아미노산을 인지하는 토끼 혈청내 항원을 이용한 Western blotting 결과 59kDa을 나타내었다 (Figure 13). Factor Xa 처리 전에는 59kDa이었으나 (lane 7) 처리 후에는 여러 밴드가 나타났으나 16kDa 밴드에서 인터루킨 -15의 m.w.를 알 수 있었다 (lane 6). 그리고 작은 여러 밴드들은 Factor Xa의 over-digestion에 의한 것으로 추정된다. 대조구로서 발현 벡터를 전이하지 않은 *E. coli*의 추출액, MBP와 결합된 닭 인터페론 감마의 Factor Xa 처리 전, 후의 amylose column 추출액 등과의 항원-항체 반응은 나타나지 않았다 (Figure 13). 따라서 인터루킨-15 유전자의 *E. coli*에서 생산 및 *in vitro*에서의 특성 분석 실험은 완료하였다.

또한, 클론된 인터루킨-15를 포유류 세포주로부터 생산하여 특성 분석을 실시하였다. 다발현을 위하여 pUC-IL-15으로부터 pcDNA plasmid (New England)로 옮겨 제작하였다. 또한 pcDNA3의 CMV 프로모터 및 Mx, tetracyclin 유도 벡터 등을 이용하여 효율적인 발현을 위한 벡터들을 제작하였다. 특히 세포 배양을 통한 발현을 위하여 벡터는 pcDNA3의 CMV 프로모터를 사용하였으며, 리포솜을 이용한 유전자 전이 후 CHO-K1 cell line에서의 발현을 검증하였다. 유전자 전이 후 인터루킨 -15가 안정적으로 발현되는 다양한 cell line (CEC-fibroblast, macrophage, T lymphoma, T hybridoma)을 성공적으로 구축하였다 (Figure 14). 이렇게 cell line으로부터 생산된 인터루킨 -15의 생물학적 역가 측정을 위하여 다

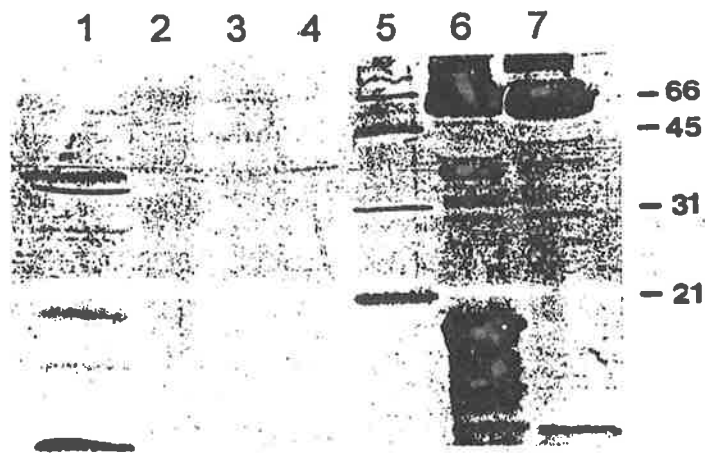


Fig. 13. Western blot of recombinant chicken IL-15. Lane 1, untransfected *E. coli* total proteins; lane 2, m.w. marker; lane 3, amylose column purified MBP-chIFN- $\gamma$  fusion protein cleaved with Factor Xa; lane 4, amylose column purified MBP-chIFN- $\gamma$  fusion protein (uncleaved); lane 5, m.w. marker; lane 6, amylose column purified MBP-chIL-15 fusion protein cleaved with Factor Xa; lane 7, amylose column purified MBP-chIFN- $\gamma$  fusion protein (uncleaved).

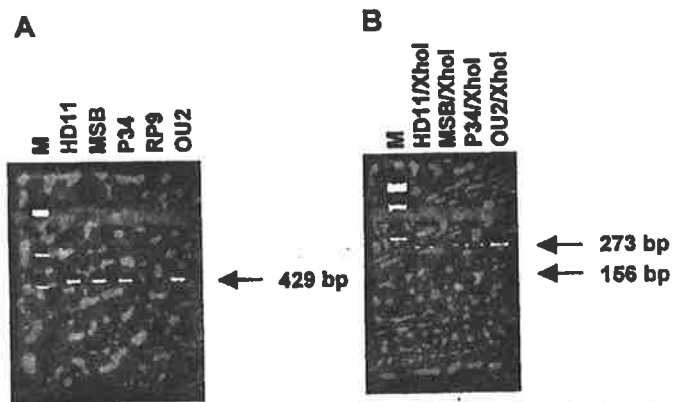


Fig. 14. RT-PCR of IL-15 gene transcript in established chicken cell lines. RT-PCR products of un digested (A) and PCR products which are digested with Xho I for 1 hour (B) were electroporesed in 2% Nusieve agarose gel. M, 50bp DNA marker; OU2, a chemically transformed chicken fibroblast cell line, CHCC-OU2; HD11, MC29-virus transformed macrophage cell line; RP9, a virally transformed chicken B cell lymphoma, LSCC-RP9; MSB1, a virally transformed T cell lymphoma, and P34, a T-cell hybridoma.



양한 conditioned media (CM) 양에 따른 spleen lymphoblast에 대한 역가를 측정하였다. 실험 결과 25% (v/v)에서 가장 최적의 lymphoblast stimulation index를 나타내었다 (Figure 15A). 또한 *E. coli*로부터 정제된 MBP-IL-15와 Factor Xa처리 후 인터루킨-15에 대한 spleen lymphoblast 활성도를 측정하였다. *E. coli*로부터 정제된 재조합 MBP-IL-15와 Factor Xa처리 후 인터루킨-15 역시 conditioned media와 유사한 활성도를 나타내었다 (Figure 15B). Figure 15C는 인터루킨-15와 Con A 첨가와 배양 시간에 따른 활성도를 측정한 결과이다.

마지막으로 클로닝된 인터루킨-15의 성계에서의 조직별 발현 양상과 Con A에 의한 spleen cell에서의 시간에 따른 발현 양상을 조사하였다. 실험 결과, caecal tonsil, 심장, 대장, 간, 근육, 난관, spleen에서 발현됨을 확인하였으며, Con A activation 이후 시간에 따른 발현 양상은 2시간-16시간까지 발현을 하였으며, 4시간에서 가장 강한 발현 양상을 나타내었다 (data not shown).

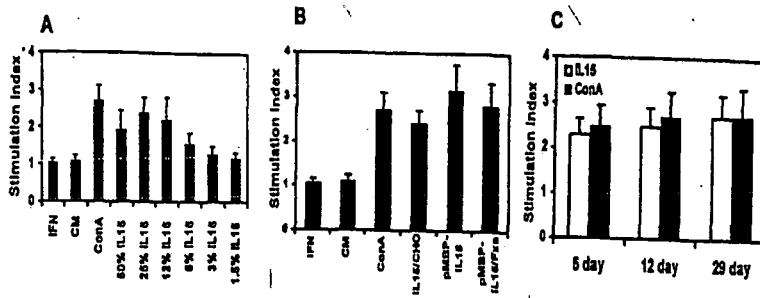


Figure 15. A. Demonstration of the dose dependent nature of IL-15 stimulation of spleen Con A lymphoblasts. Lymphocytes were stimulated with Con A for 3 days, then to fresh IMDM medium containing 10% (v/v) chicken IFN- $\gamma$  (negative control), 10% (v/v) CM from Con A stimulated spleen cells (negative control), 10 $\mu$ g/ml Con A (positive control), or various concentration of CM from CHO-K1 cells transfected with the chicken IL-15 cDNA. Proliferation was measured by the MTT assay, and expressed as the stimulation index. B. Comparison of the growth promoting activities of IL-15 expressed in *E. Coli* (pMBP-chIL-15) and CHO-K1 (IL-15/CHO) cells. pMBP-chIL-15/Fxa represented purified MBP-chIL-15 fusion protein treated with Factor Xa. C. IL-15 dependent proliferation of the splenic blast cells which have been cultured for 5, 12, 29 days in the presence of IL-15. Spleen lymphocytes were stimulated with Con A for 3 days and transferred to fresh IMDM medium containing Con A (open bars) or 25-30% CM from CHO-K1 cells transfected with the chicken IL-15 cDNA (closed bars) for 5, 12, 29 days. Proliferation was measured by the MTT assay and expressed as the stimulation index.

### 제3절 닭 질병 저항성 유전자의 *in vivo* 특성 분석

#### 1. 질병저항성 유전자의 *in vivo* 발현 벡터 개발

닭 인터페론 감마 (IFN-gamma) cDNA를 pUC19-chIFN-gamma로부터 *Eco RI*과 *Xba I* 으로 절단하여 분리하였다. CMVie 프로모터를 가지고 있는 pcDNA3 발현 벡터 역시 *Eco RI*과 *Xba I*으로 절단한 후 여기에 chIFN-gamma *Eco RI/Xba I*를 접합시켜 pcDNA3-chIFN-gamma를 재조합하였다 (Figure 16A). 그리고, RT-PCR을 통해 클로닝한 닭 인터루킨 15 (IL-15) 유전자도 pcDNA3 벡터에 재조합하였다 (Figure 16B). 제작된 발현 벡터는 CMVie 프로모터에 의해 전사가 되며 bovine poly A signal을 가지고 있어서 polyadenylation이 일어난다. 그리고 neomycin phosphoryltransferase 유전자를 가지고 있어 G418을 이용한 선발이 가능하다.

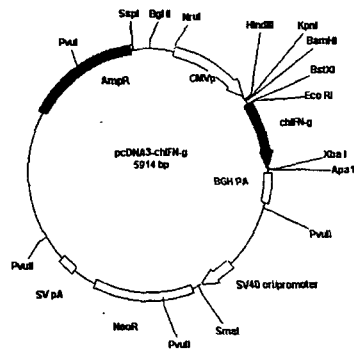
#### 2. 질병저항성 유전자의 *in vivo* 발현 특성 분석

클로닝된 닭 인터페론 감마와 인터루킨 -15에 대한 *in vivo*에서 질병저항성 역가를 측정하였다. 본 연구를 통하여 클로닝된 질병 저항성 유전자의 이용을 위해서는 *in vitro* 및 *in vivo* 에서의 질병 저항성 검증이 반드시 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 현재까지 가금에서의 많은 질병 중에서 우선 콕시듐에 대한 클로닝된 유전자의 저항성을 검증하였다. 닭 콕시듐은 발생 빈도가 높은 질병으로 장내 기생충 *Eimeria*에 의해 발생하며 닭에서 사료 이용을 저해하여 체중 감소를 가져옴으로써 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 따라서 클로닝된 질병저항성 유전자의 발현이 이러한 질병에 대하여 저항성을 나타낸다면 최종적인 목표인 형질전환 가금 생산에 있어 매우 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 닭 *Eimeria* 종에서 보존적인 항원을 발현 벡터에 재조합하여 *E. acervulina*의

항원인 3-1E 유전자 발현 벡터 pMP13을 제작하고, 대장균과 닭배자 섬유아 세포에 각각 도입하여 Western blotting과 면역 형광 염색법으로 발현을 검증하였다 (Figure 17). 본 연구에서는 클로닝된 질병 저항성 유전자의 *in vivo* 에서의 활성 측정 및 더 나아가 DNA 백신의 응용 가능성을 타진하기 위하여 *E. acervulina*의 감염 조건을 확립하였다. 방법은 각각 1일령 병아리에 재조합 3-1E 정제 단백질과 3-1E DNA 플라스미드를 주사하고 재조합 단백질의 경우에는 2주 후에, DNA 플라스미드의 경우에는 일주일 에 한 번씩 2회를 재주입하였으며, 최종적으로 일주일 후에  $5 \times 10^3$  *E. acervulina*를 감염시키는 방법을 확립하였다. 감염 후 oocyst 생산의 변화를 측정함으로써 *in vivo* 내의 생물학적 역할을 파악할 수 있었다. 실험 결과 부스트 주입 후 oocyst 수를 측정한 결과 플라스미드 3-1E와 인터루킨 -15 및 인터페론 감마를 동시에 주입하여 vaccination을 유도한 결과 확연하게 줄어드는 양상을 나타내었다 (Figure 18). 실험 결과는 6, 7, 8, 9 일의 평균 oocyst 수를 측정하였다.

한편으로 본 실험실에서 자체 개발한 닭 인터페론 감마와 인터루킨-15 유전자를 포함한 테트라사이클린 유도 벡터를 293GP cell line과 닭배자 섬유아세포에서 안정된 발현 및 유도성을 검증하였다. 제작된 벡터는 100-200ng의 언하이드로테트라사이클린의 첨가에 의해 유도됨을 보였는데, 이는 RT-PCR과 Southern blotting 그리고 Northern blotting으로 확인하였다 (data not shown). 이 결과는 원시생식세포에 전이한 후 주입하여 생산된 개체를 음수에 테트라사이클린을 첨가하여 유전자의 발현을 유도할 수 있음을 시사한다.

(A)



(B)

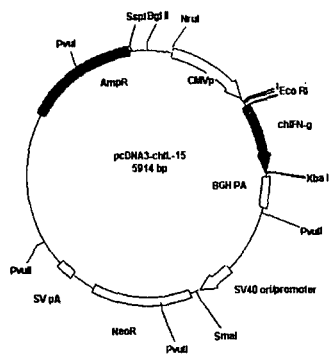


Figure 16. Construction of expression vector for transgenic chicken production using the disease resistance genes. (A) pcDNA-chIFN-gamma, (B) pcDNA-chIL-15

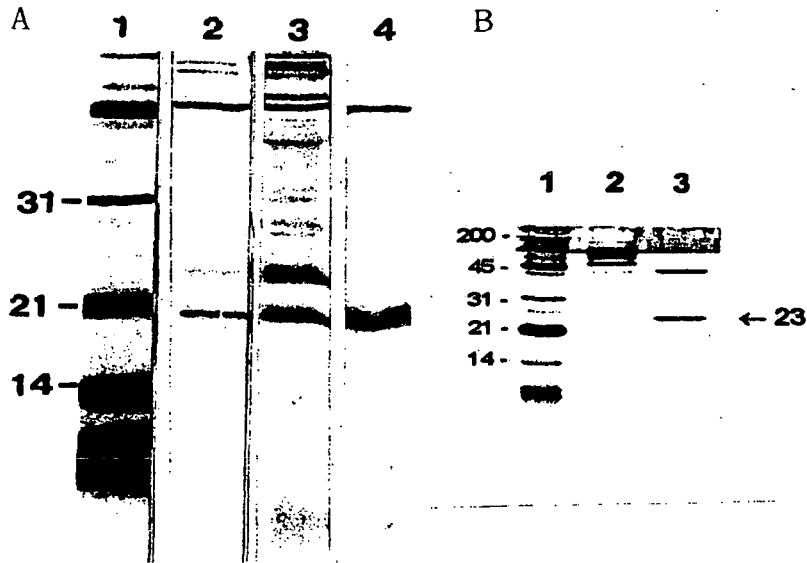


Figure 17. A. Western blot of native form of recombinant 3-1E protein. Soluble antigens from sporozites of *E. tenella* and *E. acervulina* were resolved by SDS-PAGE. Lane 1, m.w. marker; lane 2, *E. tenella* sporozites; lane 3, *E. tenella* merozoites; lane 4, *E. acervulina* sporozites. B. *E. coli* cells were transformed with recombinant pMAL/3-1E cDNA and cell extracts purified on an amylose affinity column. Lane 1, m.w. marker; Lane 2, untreated MBP/3-1E fusion protein; Lane 3, proteins treated with Factor Xa to separate MBP from recombinant 3-1E protein. The arrow indicates the position of the 23-kD recombinant 3-1E protein.

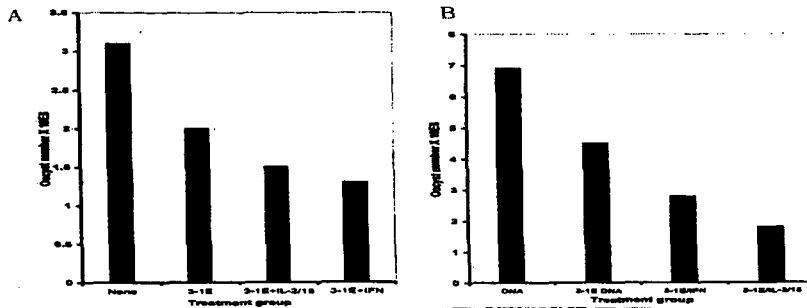


Figure 18. A. Oocyst production after immunization with recombinant MBP/3-1E fusion protein expressed in *E. Coli*. One-day-old chickens were intramuscularly immunized with either 1.0 $\mu$ g of MBP/3-1E fusion protein or 1.0 $\mu$ g of MBP/3-1E fusion protein plus 5.0 $\mu$ g of pcDNA/IL-2/15 DNA or 1.0 $\mu$ g pcDNA/IFN $\gamma$  DNA subcutaneously in complete Freund's adjuvant. Two weeks later, a second injection of 1.0 $\mu$ g of MBP/3-1E fusion protein in incomplete Freund's adjuvant was given, the chickens challenged 1 wk later with 1 $\times$ 10<sup>4</sup> *E. acervulina* oocyst, and fecal oocysts enumerated. Oocyst numbers represent the average of day 6, 7, 8, 9 postchallenge. Data from one of two independent experiments are presented. B. Oocyst production after immunization with pcDNA/3-1E cDNA. One-day-old chickens were immunized subcutaneously twice at a 1-wk interval with 100 $\mu$ g of nonrecombinant pcDNA/3-1E DNA, or pcDNA/3-1E DNA plus 1.0  $\mu$ g of pcDNA/IFN $\gamma$  or 5.0 $\mu$ g pcDNA/IL-2/15 DNA. Chickens were orally challenged 7 days later with 5 $\times$ 10<sup>3</sup> *E. acervulina* oocyst. Oocyst numbers represent the average of day 6, 7, 8, 9 postchallenge. Data from one of two independent experiments are presented.

## 제 3 장 생식선 카이메라이 효율적 생산에 관한 연구

본 장에서는 닭의 원시생식세포를 이용한 체외에서의 외래 유전자 전이 조건 확립 및 효율적인 생식선 카이메라 (germline chimera) 생산에 관한 연구를 수행하였다. 본 연구를 통하여 닭의 배발달 단계에 따라 여러 부위에서 원시생식세포를 효율적으로 분리하는 조건을 확립하였으며, 분리한 원시생식세포내로의 유전자 전이 조건을 확립하였다. 또한 원시생식기내의 원시생식세포를 이용한 높은 효율의 생식선 카이메라 생산 조건을 확립하였으며, 이를 이용한 형질전환 개체 생산을 시도하였다.

### 제1절 원시생식세포 분리 및 단기 체외 배양

#### 1. 배발달 단계에 따른 원시생식세포 분리 조건 확립

초기 발생시기에 있어 원시생식세포 (primordial germ cells; PGCs)의 부위별 분리를 위해 있어 각각 생식선 반월 (germinal crescent), 혈액, 원시생식기 (embryonic gonad)로부터 분리하였으며, Table 3과 같다. 원시생식세포의 분리를 위한 최적의 일령은 각각 생식선 반월에서 부화 1일령 (stage 6-7), 혈관에서 부화 2.5일령 (stage 17), 원시생식기내에서 부화 5.5일령 (stage 28)이었으며, 많은 수의 원시생식세포를 분리할 수 있는 조건을 확립하였다. 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하기 위하여 물리적 방법과 효소 처리에 의한 방법을 이용하여 분리하였으며, 물리적 방법이 효소 처리에 의한 방법보다 약간 많은 수의 원시생식세포를 분리할 수 있었다. 원시생식기로부터 분리된 원시생식세포의 평균수는 863개였으며,



75.3%의 생존율 (viability)을 나타내었다. 이렇게 각각의 부위로부터 분리한 원시생식세포는 PAS 염색으로 원시생식세포임을 확인 할 수 있었다 (Figure 19). Trypan blue exclusion에 의하여 70% 이상의 원시생식세포가 생존하였음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 볼 때, 원시생식기내서 분리하는 방법이 생식선 반월에서의 분리보다는 10배, 혈관으로부터의 분리보다는 8.5배의 많은 수의 원시생식세포를 확보할 수 있었다. 또한 순수한 원시생식세포만을 확보하기 위하여 Ficoll gradient centrifugation 기법을 이용하여 각 부위별 원시생식세포의 수를 측정하였으며, 이는 Table 4와 같다.

Table 4의 결과로 볼 때, Ficoll을 처리하지 않았을 경우에는 원시생식세포의 수가 전체세포 수에 비해 1% 미만이었으나 Ficoll을 처리한 후 생식선 반월에서는 45.1% (Figure 20), 혈관에서는 85.4%, 원시생식기에서는 물리적 방법에 의한 경우 80.9%, 효소 처리에 의한 경우 86.1%의 비교적 순수한 원시생식세포를 다량으로 얻을 수 있었다. 물리적 방법이 효소 처리에 의한 방법보다 초기 원시생식세포 수는 많았으나, Ficoll처리 후에 순수 원시생식세포 수가 줄었는데 이는 물리적 방법이 원시생식기 조직을 완전하게 분해하지 못하기 때문이라 생각된다. 따라서 Ficoll 처리시 원시생식세포가 분해하지 못한 조직과 같이 침전되기 때문에 Ficoll 처리 후에는 효소 처리 방법보다 약간 적은 수의 원시생식세포가 분리되는 결과를 얻었다. 혈관으로부터 분리시에 원시생식세포의 분리는 잘 되었으나 (Figure 21), 원시생식기보다 원시생식세포 숫자가 절대적으로 적었다. 따라서 원시생식세포는 원시생식기로부터 효소 처리에 의한 가장 효과적으로 분리되었으며 (Figure 22) 각 부위별 분리기법 및 분리조건을 확립하였다.

Table 3. Number and viability of primordial germ cells retrieved from germinal crescent, blood, and embryonic gonads.

Sources (embryonic age)	treatment	Number <sup>1</sup>	Viability (%) <sup>2</sup>
Germinal crescent (1 day incubation)		87.5± 1.8	67.3
Blood vessel (2.5 day incubation)		103.2± 4.0	75.7
Embroynic gonads (5.5day incubation)	Mechanical	877.2± 9.1	76.3
	Enzymetical	850.0±12.5	74.3

<sup>1</sup> The number of PGCs from one embryo was counted.

<sup>2</sup> The number of viable PGCs was determined using trypan blue exclusion method by their morphological criteria.

The morphology of PGCs was studied by PAS staining. The results showed that PGCs were PAS positive. The morphology of PGCs was similar to that of spermatogonia. The cells were large and round, with a prominent nucleus and a clear nucleolus. The cytoplasm was abundant and eosinophilic. The PAS reaction was positive, indicating the presence of glycogen in the cytoplasm.



Figure 19. The morphology of PGCs. PAS positive stained PGCs.

Table 4. Purity of primordial germ cells retrieved from germinal crescent, blood, and embryonic gonads.

Sources (embryonic age)	Purity of PGCs(%) <sup>1</sup>	
	Treatment I <sup>2</sup>	Treatment II
Germinal crescent (1 day incubation)	0.174±0.005	45.1±9.10
Blood vessel (2.5 day incubation)	0.076±0.010	85.4±1.18
Embryonic gonads (5.5 day incubation)	Mechanical <sup>3</sup>	4.174±0.011
	Enzymetical	6.431±0.062

<sup>1</sup> The purity of PGCs was the ratio of PGCs in the total cell population.

<sup>2</sup> Treatment I; before Ficoll treatment, Treatment II; after Ficoll treatment

<sup>3</sup> Gonadal PGCs were released by mechanical treatment (pipetting with 30-gauge needle) or enzymatic treatment (0.5% Trypsin-0.2% EDTA for 10 min at 37°C).

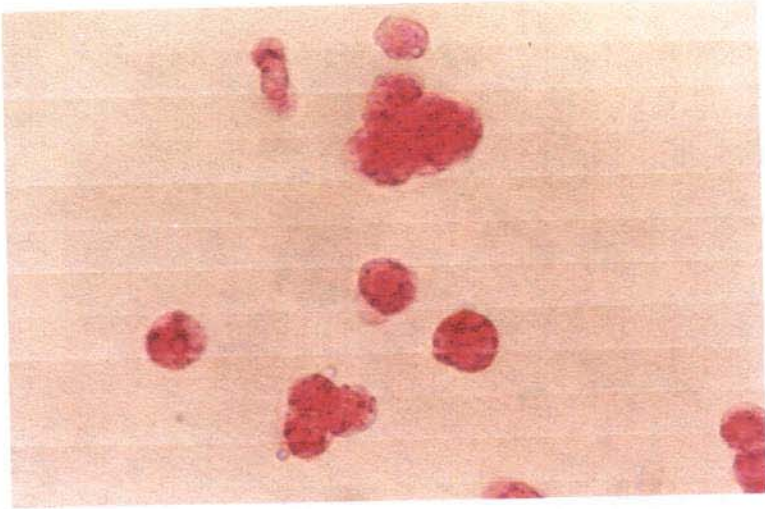


Figure 20. PGCs from germinal crescent of stage 4-8 embryos were separated by Ficoll density centrifugation. PAS stained PGCs

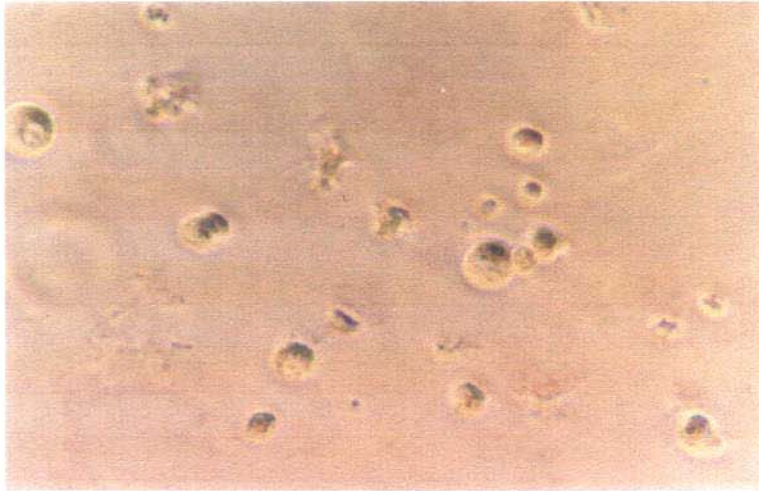


Figure 21. PGCs from embryonic blood of stage 17-18 embryos were separated by Ficoll density centrifugation.

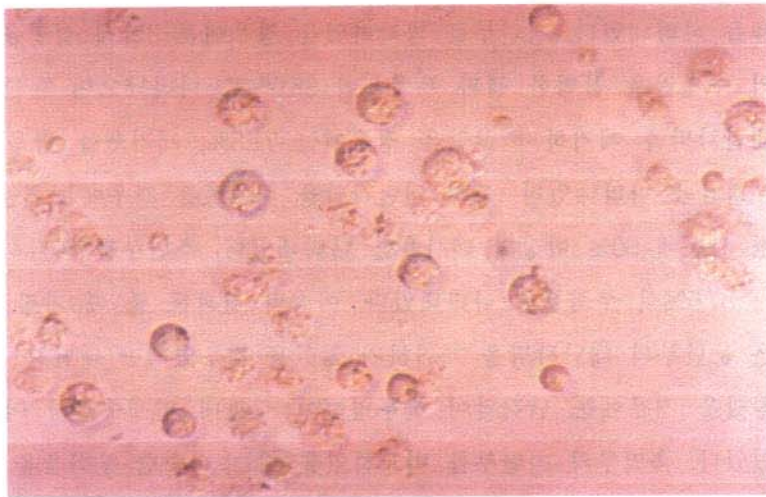


Figure 22. PGCs from embryonic gonad of stage 27-28 embryos were separated by Ficoll density centrifugation.

## 2. 수용체 배자로의 미세주입기법 확립

### 가. 배발달에 따른 미세주입법 개발

#### (난각 파각부위에 따른 생존율 비교)

배자내 원시생식세포를 주입하기 위한 최적조건을 확립하기 위하여 둔단부, 측면부, 침단부를 파각한 다음 파라필름으로 밀봉하여 생존율을 측정하였다 (Figure 23). 실험 결과 내난각막을 제거하지 않고 둔단부를 파각했을 경우가 침단부나 측면부, 파각 후 내난각막을 제거했을 때보다 높은 부화율을 나타내었다. 그러나 파각하지 않은 상태에서 부화시킨 대조구의 경우에는 74.2%의 부화율을 나타내어 파각을 한 경우에 상대적으로 낮은 부화율을 나타내었다. 침단부를 파각하였을 경우에는 3차례 실험을 통해 203개의 수정란을 실험한 결과 부화율이 38.9%로 나타났으며 둔단부는 파각후 내난각막을 제거하지 않았을 경우에는 71.3%, 제거했을 경우에는 4.5%의 부화율을 나타내었다. 특히 내난각막을 제거했을 경우에는 5일령에서 12일령 사이에 50% 이상의 폐사율을 나타내었다. 측면부를 파각하였을 경우에는 37.5%의 부화율을 나타내었다. 이상의 결과를 볼 때 가장 좋은 부화율은 둔단부의 내난각막을 제거하지 않았을 경우였지만 내난각막을 제거하지 않았을 경우에는 난각막이 불투명하여 혈관내 미세주입시 어려운 문제가 있었다. 측면부와 침단부를 비교하였을 때는 비슷한 부화율을 보였지만 측면부는 배자의 혈관을 찾기가 힘들다는 단점이 있어 본 연구실에서는 미세주입을 위한 주입구를 침단부에 파각하는 것을 조건으로 확립하였다. 파각 후 밀봉 조건을 확립하기 위해서 파라필름, 멸균 랩, 테이프를 이용하여 실험을 실시한 결과 파라필름으로 두 번을 밀봉하였을 경우가 가장 안정적이고 높은 부화율을 나타내어 이를 밀봉 조건으로 확립하였다 (data not shown).



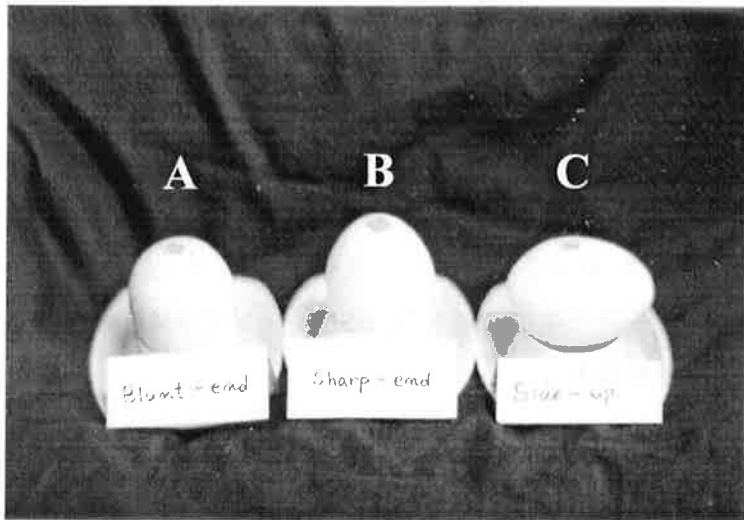


Figure 23. Windowed eggs. (A) 둔단부 (B) 첨단부 (C) 측면부

#### 나. 외래 원시생식세포의 혈관내 미세주입법 개발

원시생식세포를 혈관내 미세주입하기 위한 조건을 확립하기 위하여 PBS CRS (chicken ringer's solution), 세포 배양액을 2.5일령 (stage 28) 배자에 각각 약  $2\mu\text{l}$  주입하여 부화율을 측정하였다. PBS, CRS, media를 위에서 확립된 침단부를 통하여 미세주입을 실시한 결과 부화율이 각각 25%, 26%, 28%를 나타내어 부화율에는 크게 차이가 없었다. 따라서 외래 원시생식세포를 미세주입하기 위한 최적의 조건으로 배양액에 희석하는 방법으로 설정하였다.

### 3. 원시생식세포의 단기 체외 배양 조건 확립

#### 가. 원시생식세포 분리

체외 단기 배양 (10일 이내의 체외 배양)을 위한 원시생식세포는 위에서 확립된 분리 조건에 의해 각각 1일령 생식선 반월 (germinal crescent), 2.5일령 혈액, 5.5일령 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하였다. 분리된 원시생식세포는 형태학적, PAS 염색, SSEA-1 항체검색법에 의해 원시생식세포임을 확인하였다.

#### 나. 원시생식세포 기본 배양액 조건 확립

원시생식세포의 배양을 위해 우선 가장 기본적인 최적의 배양액을 확립하고자하는 실험을 수행하였다. 원시생식세포 배양을 위해 사용된 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Glasgow-MEM (Glasgow Modified Eagle Medium)을 사용하였다. 실험 결과 DMEM과 Glasgow-MEM간의 원시생식세포 배양에는 큰 차이가 없었으나, 일반적으로 원시생식세포 배양이나 ES cell 배양시 DMEM을 주로 사용하여 기본 배지로 DMEM 사용 조건을 확립하였다. 기본 배지로 사용된 DMEM 배지

는 고농도 glucose가 함유된 ES cell 배양용 배지를 사용하였다.

#### 다. 원시생식세포 배양을 위한 기본 성장 촉진 인자 첨가 조건 확립

본 실험실에서 원시생식세포의 배양을 위한 최적의 조건으로 각종의 성장 촉진 인자 및 여러 요소를 이용한 배양액을 확립하였다. 성장 촉진 인자로 leukemia inhibition factor (LIF-1), stem cell factor (SCF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), interleukin-11 (IL-11) 등을 사용하였다. LIF, SCF, bFGF는 마우스에서 원시생식세포를 배양시 기본적으로 사용되는 성장 촉진 인자이며 IGF-1과 IL-11은 마우스의 원시생식세포의 체외 배양시 성장 촉진 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 IGF-1과 LIF는 인체로부터 유래된 것을, SCF와 IL-11은 마우스에서 유래된 것을, bFGF는 소에서부터 유래된 것을 각각 사용하여 조건을 확립하였다. 이러한 성장 촉진 인자에 대한 각각의 최적 농도는 LIF가 1ng/ml, SCF 5ng/ml, bFGF 0.5ng/ml, IGF-1 10ng/ml, IL-11 0.04ng/ml로 조건을 확립하였다.

#### 라. 원시생식세포 배양을 위한 생존인자 및 성장 촉진인자 조건 확립

원시생식세포 배양을 위한 기본적인 성장 촉진 인자 이외에 보다 효율적인 생존과 성장 촉진을 위한 다양한 요소를 첨가하여 조건을 확립하였다. 기본 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 2% chicken serum, 1mM sodium pyruvate, 1× non-essential amino acids, 1× 2-mercaptoethanol을 사용하였다. 또한 항생제는 antibiotic-antimycotics와 streptomycin/penicillin으로 배양을 시도하였으나 antibiotic-antimycotics보다는 streptomycin/penicillin이 ES cell 배양시 ES cell에 대한 약간의 독성이 적은 것으로 보고되어 최종적으로 streptomycin / penicillin을 배양조건

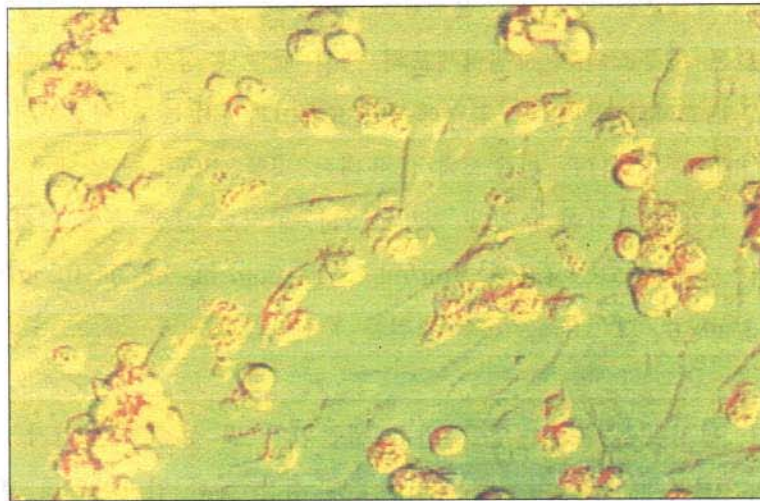


Figure 24. Cultured PGCs derived from 6-day-old embryos on the gonadal stroma cells for 7 days. Characteristics of PGCs are eccentric nucleus and large size ( $\times 300$ ).

으로 확립하였다. 위와 같이 확립된 조건으로 원시생식세포를 단기간 배양에 성공하였다 (Figure 24).

#### 마. 원시생식세포 배양을 위한 배양용기 및 well당 원시생식기 수에 대한 조건 확립

원시생식세포 배양을 위한 최적의 배양용기 및 well당 적절 원시생식세포 및 원시생식기 수에 대한 조건 확립하였다. 사용된 plate는 각각 96 well plate, 24 well plate, 12 well plate가 사용되었으나 96 well plate는 너무 작아 실질적인 조작이 매우 어려운 점이 있으며, 12 well plate의 경우에는 많은 양의 원시생식세포를 배양할 수는 있으나, 한 번에 많은 양을 동시에 처리해야 하는 단점이 있었다. 따라서 본 실험에서는 최적의 배양용기로 24well plate를 확립하였다. 또한 well당 원시생식기를 각각 2개, 3개, 6개, 9개씩 (평균  $6 \times 10^5$  cells/embryo) 배양을 실시하여 2-3개 정도 ( $1.0 \sim 1.4 \times 10^5$  gonadal cells) 의 원시생식기 배양을 최적 조건으로 확립하였다. 이는 24well plate당 2개는 너무 적은 수이며 6개 혹은 9개는 너무 많아 빠른 성장으로 세포들이 하나로 말리는 현상 (rolling-up)이 자주 발생하는 단점이 있다. 배양시 feeder cell로는 다른 세포주를 사용하지 않고, 원시생식기내 존재하는 gonadal stroma cell을 사용하는 조건을 확립하였다. gonadal stroma cell은 원시생식세포와 달리 배양용기 바닥에 부착되어 성장하기 때문에 원시생식세포와는 쉽게 구분이 가능하였다 (Figure 24).

#### 바. 배양 후 원시생식세포의 특성 규명

##### 1) 형태학적 특징 규명

Figure 24에서 보는 바와 같이 단기간 배양 후에도 크기가 매우 크고 핵이 한 쪽으로 치우쳐 있으며, 많은 granule들을 함유하고 있으므로 단기

배양을 하더라도 원시생식세포의 특징을 그대로 보존하고 있음을 알 수 있다.

#### 2) PAS 염색에 의한 특성 규명

7일간의 단기간 배양 후 원시생식세포의 특성을 규명하기 위하여 PAS 염색을 실시하였다. 염색 결과 생식선 반월 부위나 혈액내의 원시생식세포와 동일한 양상으로 염색되는 것을 알 수 있었다. 따라서 이는 원시생식세포의 단기간 체외 배양 후에도 생리적으로 원시생식세포의 특성 변화 없이 동일한 양상을 가지고 있음을 알 수 있다 (Figure 25).

#### 3) SSEA-1 항체 검색법에 의한 특성 규명

PAS 염색과 동시에 단기 배양 후에도 원시생식세포와 동일한 항원 반응을 검색하기 위하여 원시생식세포 특이 항체인 SSEA-1을 이용한 항원 검색을 하였다. 본 실험에 사용된 SSEA-1 항원은 독일의 Solter 박사팀에서 개발되어 미국 아이오와 대학내 Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)에서 판매되는 것을 구입하여 사용하였다. SSEA-1 항원에 의한 검색 결과 7일간의 배양 후에도 원시생식세포는 동일한 양상을 보여주고 있음을 알 수 있다 (Figure 26).

#### 4) 배양 후 원시생식세포의 분열 양상 확인

배양 기간동안 원시생식세포의 분열을 확인하기 위하여 thymidine bromodeoxyuridine (BrdU, Boeringer-Manheim Biochemica)의 키트를 이용한 실험을 수행하였다. 실험 결과, 일주일 배양한 원시생식세포의 경우 BrdU의 incorporation과 antibody screening으로 원시생식세포의 분열을 확인할 수 있었다. 이는 본 실험실에서 확립한 배양액 및 배양조건에 의해 원시생식세포가 체외에서 안정적으로 분열, 증식하고 있을 알 수 있다. 원시생식세포의 분열은 배양 2일령에서 초기 원시생식세포 수에 약 170%가

지 증가하며, 이 후 7일령까지 조금씩 감소하였다. 이는 원시생식세포가 초기에 분열을 활발하게 시작하다가 배양 일수가 증가 할수록 죽는 세포와 새로 증식하는 세포간의 일정한 수가 유지되고 있음을 알 수 있다. 따라서 본 실험실에서 확립한 체외 배양 조건은 원시생식기내 원시생식세포의 형태학적, 생리학적 특징이 유지될 뿐만 아니라 일정한 세포수로 안정적으로 증식 및 분열함을 알 수 있다 (Figure 27).

따라서 이상의 결과로 볼 때, 본 실험실에서 확립한 원시생식세포의 배양 조건은 배양 후에도 원시생식세포 고유의 형태학적, 생리학적 특징을 보존하고 있음을 알 수 있으며, 체외 배양 조건에서도 성공적으로 분열, 증식하고 있음을 알 수 있었다. 이에 형질전환 닭 생산을 위한 외래 유전자 전이시 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제2절 원시생식세포내로의 효율적인 유전자 전이

현재까지 형질전환 닭 생산을 위한 연구 수행에 있어서 전세계적으로 가장 문제점으로 대두되고 있는 것이 원시생식세포를 포함한 닭 유전체 (genome)내로의 효율적인 유전자 전이 (gene transfer)이다. 이는 닭의 경우에는 포유류와 달리 소형 염색체 (micro chromosome)가 많기 때문에 상대적으로 외래 유전자 효율이 매우 낮다. 따라서 이를 극복하기 위하여 본 연구에서는 리포솜 (liposome)과 전기 충격법 (electroporation) 방법을 이용하여 실험을 수행하였다.

### 1. Liposome에 의한 전이

현재 세계적으로 리포솜을 이용한 유전자 전이 효율은 20-30%정도에 머물러 있다. 이에 본 연구에 있어서 리포솜을 이용한 보다 효율적인 유전자 전이 여부를 확인하였다. 리포솜에 의한 유전자 전이 효율은 생식기내 생

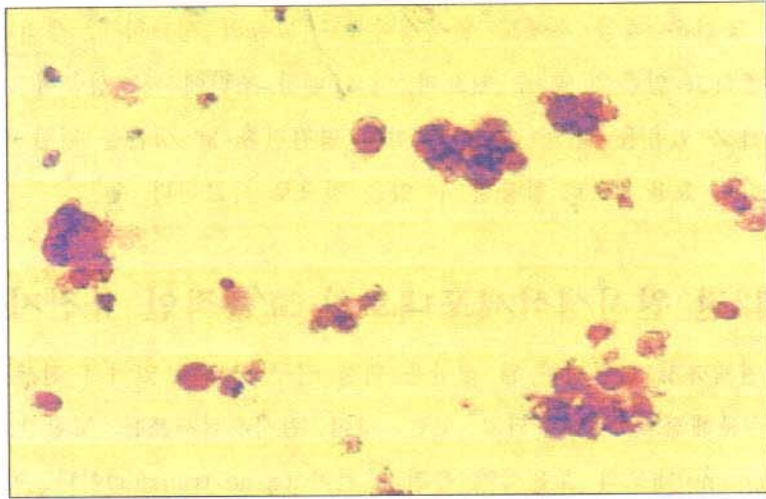


Figure 25. Periodic Acid-Schiff's (PAS) stained PGCs. Cultured PGCs were almost PAS-positive ( $\times 200$ ).



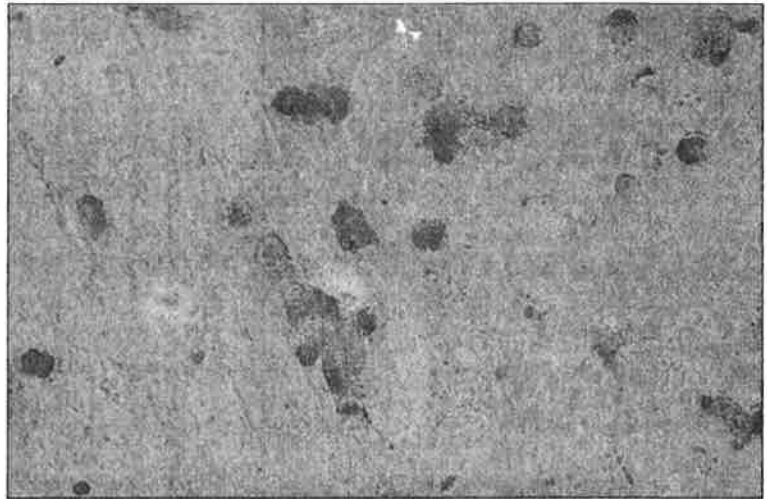
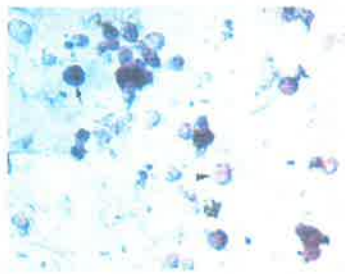


Figure 26. Immunocytochemical staining of PGCs using the monoclonal antibodies (SSEA-1). PGCs were anti-SSEA-1 positive after 7 days culture ( $\times 300$ ).

(a)



(b)

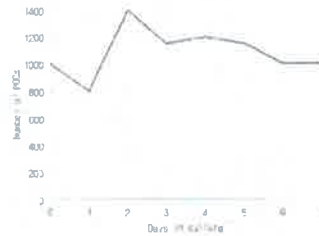


Figure 27. Proliferation assay for PGCs. The demonstration of PGCs proliferation was performed by incorporation of BrdU into cellular DNA(a). The number of PGCs were increased during 7 days culture period(b).

식세포 (gonadal primordial germ cell ; gPGCs)와 닭 배자섬유아세포 (chicken embryonic fibroblast ; CEF)를 이용하여 검증하였다. 표지 유전자는 CMV 프로모터에 GFP 및 Lac Z를 plasmid mega-prep. kit (Qiagen, Inc.)을 사용하여 정제하였으며, 리포솜은 LipofectAMINE (Gibco)을 이용하여 검증하였다. 유전자 전이를 위하여 원시생식기를 효소 처리 방법에 의하여 단일 세포로 분리하여 96-well plate에 1일 배양한 후 사용하였다. 최적 조건으로 well당 20 $\mu$ l Opti-MEM (Gibco)과 400ng DNA 혼합액과 20 $\mu$ l Opti-MEM (Gibco)과 4.8 $\mu$ g LipofectAMINE의 혼합액을 조심스럽게 혼합한 후 실온에서 30분간 정치하였다. 원시생식세포는 유전자 전이 전에 PBS로 1회 세척을 하여 DNA/liposome 혼합액을 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 3시간동안 배양하였다. 3시간의 배양 후에는 원시생식세포 배양액으로 교환하여 표지 유전자 발현 양상을 검증하기 위하여 24시간동안 더 배양하였다. 24시간의 배양 후에는 Ficoll을 이용하여 원시생식세포만을 순수 분리하여 GFP 또는 Lac Z 분석을 수행하였다.

## 2. 전기충격법 (Electroporator)에 의한 외래 유전자 전이

전기충격법에 의한 유전자 전이 효율을 검증하기 위해서도 리포솜과 같이 원시생식세포와 닭 배자섬유아세포를 이용하여 검증하였다. 전기충격을 위한 큐벳당 원시생식세포 수는 1.6 $\times 10^6$ , 닭 배자섬유아세포는 2.3 $\times 10^6$ 을 사용하였다. 400 $\mu$ l Opti-MEM와 10% FBS (fetal bovine serum)에 20 $\mu$ g DNA를 혼합하여 사용하였으며, 전기 충격 조건은 200-300 voltage, capacitance 250-950 $\mu$ f를 이용하여 검증하였다. 또한 유전자 효율을 극대화시키기 위하여 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 1.25%(v/v) 비율로 첨가하는 조건을 사용하였다. 큐벳은 사용전 얼음에 정치하여 사용하였으며, Opti-MEM, FBS, DNA 및 DMSO 혼합액을 큐벳에 넣은 후 1분간 실온에

정치하고, 이를 전기충격 장치 (electroporator ; Bio-Rad, Inc.)에 의해 전기 충격을 가한 후 다시 얼음에 10분을 정치하였다. 유전자 전이 후 원시생식세포는 96-well plate에서 1일 배양하여 표지 유전자 발현 양상을 검증하였다. 유전자가 전이된 원시생식세포 24시간의 배양 후에는 Ficoll을 이용하여 원시생식세포만을 순수 분리하여 GFP 또는 Lac Z 분석을 수행하였다.

### 3. 전이된 외래 유전자의 발현 양상 검증

표지 유전자 검사를 위한 형광 검색, X-gal 염색 및  $\beta$ -galactosidase 분석은 다음과 같이 수행하였다. Lac Z의 경우에는 1% glutaraldehyde에 의해 고정시킨 후, X-gal 첨가에 의하여 발색 반응을 확인하였으며 (Figure 28), GFP에 대한 형광 검색은 형광 현미경 (Olympus, IX-70)하에서 형광 필터 460-490nm (U-MWIB, Olympus)를 이용하여 488nm GFP 형광을 검색하였다. GFP 경우 세포에 특별히 다른 처리없이 확인할 수 있기 때문에 살아있는 상태에서 표지 유전자 발현 양상 검증이 가능하였다 (Figure 29). 특히, Lac Z 경우에는 X-gal 염색에 의한 발현 정도를 측정할 수 있었으며, 이를 이용한 최적 발현 조건을 결정하였다. Lac Z 유전자 전이 후 원시생식세포를 Ficoll에 의해 순수 분리한 후 1% glutaraldehyde에서 5분간 고정하였으며, PBS로 2회 세척 후 X-gal을 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-4시간을 배양하여 발현 양상을 파악하였다.  $\beta$ -galactosidase 분석은 유전자가 전이된 원시생식세포와 닭 배자섬유아세포를 lysis buffer (0.2% triton-100, 100mM potassium phosphate buffer pH7.8, 1mM dithiothreitol)에 의해 세포를 파괴하여 세포질액을 분리하였으며, 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin)을 이용하여 농도를 측정하였다. 전기 충격법에 의한 유전자 전이 조건으로 200-300 voltage, capacitance 250-950 $\mu$ F

검증 결과는 Figure 30과 같다. 이상의 결과로 볼 때 최적의 조건은 250V, 950 $\mu$ F에서 원시생식세포내 외래 유전자 효율이 가장 높았다.

또한 전기 충격법에 의한 유전자 전이 효율의 극대화를 위하여 DMSO를 첨가하는 조건을 확립하였다. DMSO는 1.25% (v/v)를 사용하였으며 전기 충격 조건은 전과 동일하게 이용하였다. 유전자 전이 효율은 DMSO를 사용하지 않은 경우보다 DMSO를 사용한 경우에서 약 2배 이상의  $\beta$ -galactosidase 역가를 나타내었다 (Figure 31). 그러나 닭 배자섬유아세포의 경우에는 DMSO의 첨가에 의하여  $\beta$ -galactosidase 역가는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. DMSO는 세포 동결 등에 사용되는 물질로 세포막의 안정성을 증강시키는 기능을 가지고 있어 전기 충격시 세포막의 안정성을 높여줌으로써 외래 유전자의 전이 효율을 높일 것으로 생각된다.

이상과 같이 리포솜과 DMSO를 첨가한 최적의 전기충격법으로 원시생식세포내 외래 유전자 효율의 비교는 Table 5와 같다. 리포솜을 이용한 유전자 전이는 기존에 보고된 20-30% 정도를 넘지 못하는 비슷한 결과를 나타냈으나, DMSO와 전기충격법을 이용한 유전자 전이는 80%까지의 높은 효율을 나타내어 이를 이용한 유전자 전이 및 형질전환 닭 생산은 보다 효율적이고 빠르게 진행될 것으로 생각된다. 결론적으로 원시생식세포에 대한 X-gal 염색에 의한 유전자 전이 효율은 리포솜이  $23.0 \pm 2.0$ , 전기 충격법이  $80.3 \pm 14.8\%$ 로 나타나 전기 충격법에 의한 유전자 전이 효율이 4배 이상 매우 높은 것으로 나타났다. 이는 현재 세계적으로 보고되고 있는 원시생식세포내 유전자 전이 효율에 비해 월등하게 높게 나타났다.

### 제3절 원시생식세포를 이용한 생식선카이메라 생산

#### 1. 수용체에 안정적 주입 기법 확립

원시생식세포를 수용체에 안정적으로 주입하기 위한 최적의 방법으로



Figure 28. Detection of Lac Z expression with X-gal staining in gPGCs cultured for 24 hours after transfection by electroporation with DMSO ( $\times 200$ ). Gonadal PGCs on stroma cells were stained with X-gal.

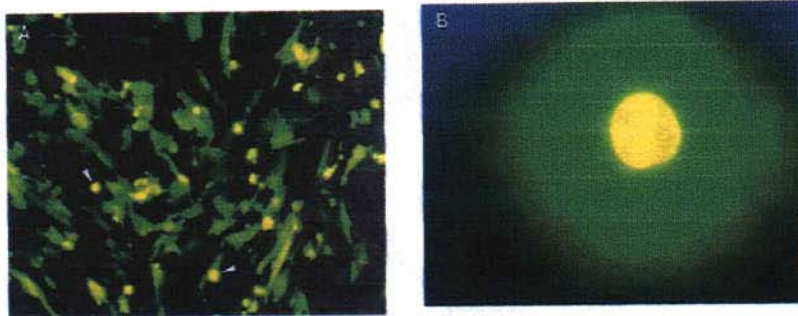


Figure 29. Detection of GFP expression with fluorescence microscopy in gPGCs for 24 hours after transfection by electroporation with DMSO. Gonadal cells were isolated from 6-day-old embryos and cultured for 24 hours after transfection with pCMV-GFP. Arrow indicates the transfected gPGCs and other cells were gonadal stroma cells (A:  $\times 200$ , B:  $\times 400$ )

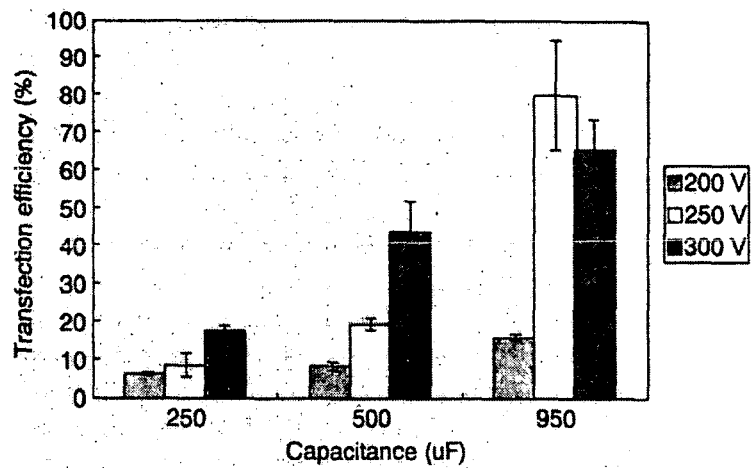


Figure 30. Comparison of transfection efficiency at different electroporation conditions in gPGCs. The transfection efficiency was measured as the percentage of transfected gPGCs in total gPGCs. Essentially the same results were obtained in three separate experiments



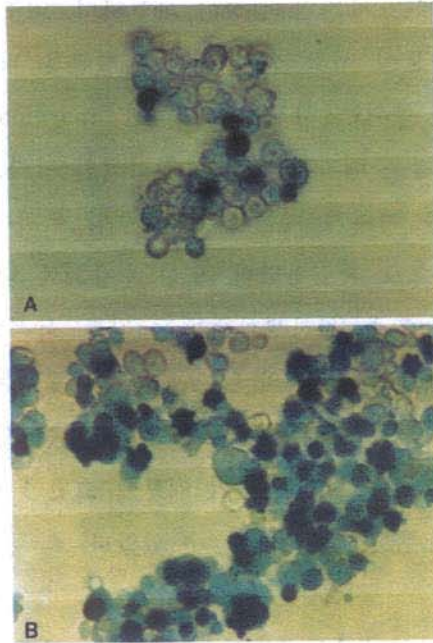


Figure 31. Detection of *Lac Z* expression with X-gal staining in gPGCs cultured for 24 hours after transfection with liposome (A), or electroporation with DMSO (B) (X400). Gonadal cells were isolated from 6-day-old embryos and cultured for 24 hours after transfection with pCMV  $\beta$ . gPGCs were purified using Ficoll gradient centrifugation and stained with X-gal.

2.5일령 배자 (stage 28)의 미세 혈관에 원시생식세포를 고농도 ( $\mu\text{l}$ 당 200 세포 이상)로 농축시켜 주입하였다. 미세주입에 사용된 미세바늘은 약 20~24 $\mu\text{m}$ 의 지름으로 각도 30°인 바늘을 사용하였으며, 미세주입 양은 2 $\mu\text{l}$  내외로 조건을 확립하였다. 원시생식세포가 포함되어있는 미세주입량을 너무 많이 주입 시에는 배자의 심장이 파열되며, 너무 적은 양을 주입 시에는 고농도의 세포들이 서로 뭉쳐 배자의 혈관을 막게되는 현상이 없도록 하였다. 미세주입 부위는 각각 미세 혈관, marginal vein에 주입한 결과 marginal vein의 경우 배자의 심장에 직접적인 압력으로 파열 위험이 높으며, 배자에 영향을 미치기 때문에 미세 주입 부위는 배자의 양쪽의 미세 혈관을 최적 조건으로 확립하였다. 또한 수용체에 미세주입시 배자의 심장 파열 방지와 수용체내 원시생식세포 제거를 목적으로 배자의 marginal vein으로부터 미세주입 전에 약 5~7 $\mu\text{l}$ 의 혈액을 추출하는 기법을 확립하였다. marginal vein은 다른 혈관보다 보다 많은 양의 혈액을 빠른 시간 내에 안정적으로 추출을 할 수 있기 때문에 그만큼 배자에 영향을 주지 않고 높은 생존율과 부화율을 유지할 수 있었다.

## 2. 원시생식기내 원시생식세포의 이동 능력 검증

앞서 언급한 바와 같이 원시생식세포를 가장 많은 수로 가장 효율적으로 분리할 수 있는 배발달 단계는 원시생식기로부터 분리하는 것이다. 그러나 이러한 경우 무엇보다도 중요한 것이 배발달 단계를 역행하는 것이므로 수용체 배자내로 주입했을 경우, 수용체 배자의 원시생식기로의 재이동 능력이 있는지를 검증하는 것이 필요하다. 따라서, 원시생식기내 원시생식세포의 이동 능력을 검증하기 위하여 PKH26 형광으로 염색을 하여 2.5일령의 수용체에 주입한 후 6일령 배자의 원시생식기내에서의 존재 유무를 확인하였다. Figure 32과 같이 원시생식기내 원시생식세포도 수용체 배자에 주

Table 5. Comparison of transfection efficiency between using electroporator with DMSO and liposome in gPGCs

Transfection method	% transfected gPGCs in total gPGCs <sup>a</sup>
LipofectAMINE	23.0±2.0
Electroporation	80.3±14.8

<sup>a</sup> The transfection efficiency was measured as the percentage of transfected gPGCs in total gPGCs. Data are shown as average ± SD of triplicate measurements. Essentially the same results were obtained in three separate experiments.

입시 정상적인 이동 능력과 분열 능력을 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서 이는 5.5일령의 원시생식기내 원시생식세포가 수용체 배자 주입시 이미 3일의 배발달 단계가 지난 후일지라도 이동 능력을 그대로 가지고 있음을 보여주며, 이를 이용한 생식선 카이메라 생산도 가능성을 제시하고 있다.

### 3. 원시생식세포의 미세 주입에 의한 실험 축군 확립

원시생식기내의 원시생식세포를 미세주입하여 최종적으로 생식선 카이메라 여부를 검증하기 위한 실험축군을 생산하였다. 본 실험에서는 공여체 (donor)는 오골계를 사용하였으며 수용체 (recipient)는 화이트 레그혼 (White Leghorn)을 사용하였다. 실험 축군은 원시생식기내의 원시생식세포를 직접 수용체에 미세주입만을 한 경우 (set I)와 직접 미세주입과 본 연구를 통하여 확립한 5일 동안의 단기간 배양 후 수용체에 미세주입한 경우 (set II)로 두 번에 걸친 실험을 수행하였다. 원시생식세포의 분리, 단기 체외 배양, 수용체로부터 혈액 추출 및 미세주입은 모두 위에서 확립한 조건대로 수행하였다. 이렇게 생산하여 성성숙까지 이른 후 검정 교배에 사용된 개체는 set I에서 수컷이 24마리, 암컷이 36마리이며, set II에서 직접 미세주입한 경우에는 수컷이 18마리, 암컷이 9마리였으며, 5일간 배양 후 미세주입한 경우에는 수컷이 17마리, 암컷이 17마리였다. Set II에 대한 후대 검정에 의한 카이메라 효율은 Table 6과 Table 7에 제시하였다. 본 실험에서 사용된 축군은 오골계 배자의 원시생식세포를 위에서 확립된 방법을 이용하여 화이트레그혼 배자에 미세주입하여 생산하였으며, 성성숙 일령에 이른 후 각각의 개체를 오골계와 교배하였다. 따라서 태어난 자손에 대하여 미세 주입한 원시생식세포로부터 유래된 개체임을 판별하기 위하여 자손의 깃털 색에 따른 표현형을 기준으로 판별하였다. 즉, 정상외 화이트레그혼을 오골계와 교배하면 병아리의 깃털 색은 흰색 개체가 태어나지만

오골계의 원시생식세포를 가진 화이트레그혼 (WL(KNOC))인 개체에서 미세 주입한 오골계의 원시생식세포에서 유래된 경우에는 순수한 오골계가 태어나게 된다. 따라서 이러한 후대검정을 통하여 생식선카이메라의 유무를 판정할 수 있다 (Figure 33).

원시생식세포를 직접 주입한 일차 실험 (Set I)에서 평균 0.37%로 낮은 생식선 카이메라 효율을 보여주고 있으나 set II에서의 원시생식세포를 5일간 단기 배양하여 미세 주입하였을 경우 직접 미세 주입한 경우보다 높은 효율로 생식선 카이메라가 생산되어 단기 배양 후에도 생식세포의 기능을 그대로 유지하는 것을 알 수 있었다. Set II의 생식선 카이메라가 생산된 개체에 대한 개체 효율은 Table 7에 제시하고 있다. Table 7에서 제시한 set II의 개체별 생식선 카이메라 효율을 보면 배양된 원시생식세포를 사용한 경우 16%, 28%로 원시생식세포를 직접주입한 일차 실험의 결과나 Table 6에서 제시한 set I의 직접 미세주입법보다 개체별 생식선 카이메라 효율이 월등하게 향상되었다. 이와 같이 원시생식기내 원시생식세포의 단기 배양을 통하여 미세주입한 경우 생식선 카이메라 효율이 20% 이상이 되는 것을 알 수 있었으며, 이는 앞으로 형질전환 닭 생산을 매우 효율적으로 빠른 시일 내에 생산할 수 있는 기반을 마련하였다고 할 수 있다.

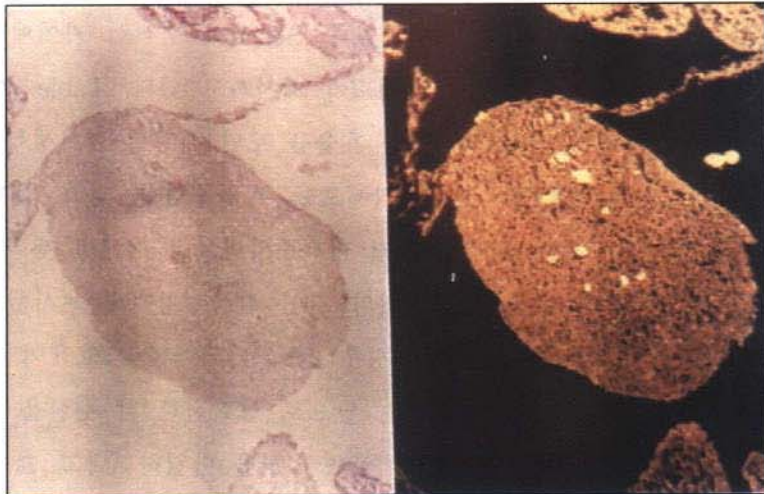


Figure 32. Paraffin embedding section of 6-day-old embryo gonads injected PKH26 labelled gonadal PGCs. Fluorescent signals were detected under the fluorescence microscope



Figure 33. Black Ogol chicken was derived from microinjected PGCs by progeny test. White chicks were cross-hybrids between White Leghorn and Ogol chicken.

Table 6. The efficiency of germline transmission (set II).

	sex	No. of progeny tested individuals <sup>a</sup>	No. of chickens hatched <sup>b</sup>	No. of black chickens <sup>c</sup> (%)	No. of white chickens
Non-cultured	male	18	5,860	2 (0.03%)	5,858
	female	9	412	0 (0.00%)	412
		27	6,272	2 (0.03%)	
cultured	male	17	1,961	18 (0.92%)	1,943
	female	17	1,053	1 (0.09%)	1,052
		34	3,014	19 (0.63%)	
total		61	9,286	21 (0.23%)	9,265

<sup>a</sup> The WL embryos injected by KNOC PGCs were incubated until hatching. The sexually matured chickens(WL(KNOC)) are counted

<sup>b</sup> The WL(KNOC) individuals were mated with KNOC and the offsprings were counted

<sup>c</sup> Black color incubated indicated that the progeny was derived from the donor(KNOC) PGCs



Table 7. The individual efficiency of germline transmission (set II).

	sex	No. of progeny tested individuals <sup>a</sup>	No. of chickens hatched <sup>b</sup>	No. of black chickens <sup>c</sup> (%)	No. of white chickens
Non-cultured	male	J110	342	2 (0.58%)	340
		1	342	2 (0.58%)	
cultured	male	54	54	9 (16.67%)	45
		68	32	9 (28.13%)	23
	female	J013	59	1 (1.69%)	58
		3	145	19 (13.10%)	
total	4	487	21 (4.31%)	466	

<sup>a</sup> The WL(KNOC) individuals were mated with KNOC and the offsprings were counted

<sup>b</sup> Black color incubated indicated that the progeny was derived from the donor(KNOC) PGCs

## 제4절 형질전환 개체 생산을 위한 연구

### 1. 외래 유전자가 도입된 원시생식세포의 이동 및 수용체 배자내 분열 능력 검증

리포솜(liposome)을 이용한 원시생식세포에 유전자 전이 방법은 본 연구실에서 확립된 방법을 이용하여 실험을 수행하였다. 즉, plate의 한 well당 20 $\mu$ l OPTI-MEM (Gibco)과 400ng DNA 혼합액과 20 $\mu$ l OPTI-MEM (Gibco)과 4.8 $\mu$ g LipofectAMINE의 혼합액을 조심스럽게 혼합한 후 실온에서 30분간 정치하였다. 원시생식세포는 유전자 전이 전에 PBS로 1회 세척을 하여 DNA/liposome 혼합액을 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 3시간동안 배양하였다. 3시간의 배양 후에는 원시생식세포 배양액으로 교환하였다. 그러나 리포솜을 이용한 유전자 전이 후 *in vitro*의 원시생식기에서의 유전자 발현을 확인하였으나 (Figure 34), 리포솜을 이용한 실험축 생산은 수행하지 않았다. 이는 리포솜을 이용한 유전자 전이 효율보다 전기충격법을 이용한 유전자 전이 효율이 매우 높고, 리포솜이 원시생식세포에 어느 정도의 독성을 가지고 있었다. 따라서, 본 연구 수행에 있어서 질병저항성 유전자 전이에 의한 형질전환 개체 생산을 위한 실험축 조성은 전기충격법을 이용한 방법을 사용하였다.

### 2. 질병 저항성 유전자 전이 개체 생산

#### 가) 유전자 도입 개체의 검증 및 확인

##### 1) 실험축 조성을 위해 사용된 유전자

본 실험에서는 질병 저항성 유전자와 표지 유전자를 사용하여 실험축 조성을 하였다. 질병저항성 유전자로써는 MAR 서열 (효율적인 유전자 발현을 위한 조절 인자)과 Mx (외래질병체에 대한 발현을 유도하는 조절인자),

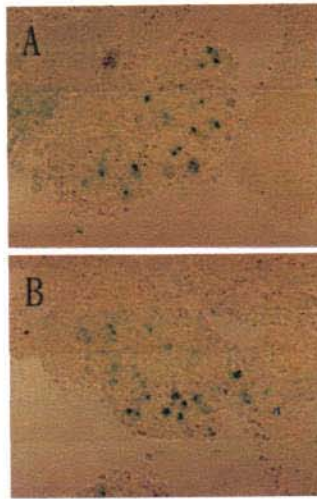


Figure 34. Expression of *Lac Z* in 10-day-old squashed embryonic gonad. The gonadal PGCs, which were transfected by lipotectAMINE, were injected into blood vessel of recipient embryos.

Table 8. List of expression vector used for experimental stocks

vector	promoter	gene	
Mx-IFN $\gamma$	Mx promoter	IFN $\gamma$	inducible for foreign pathogene
MAR-CMV-IFN $\gamma$	CMV promoter	IFN $\gamma$	stable expression with Mar element
TCT-IFN $\gamma$	CMV <sub>mini</sub> promoter	IFN $\gamma$	inducible for tetracycline
TCT-IL15	CMV <sub>mini</sub> promoter	IL15	inducible for tetracycline

TCT (테트라사이클린 유도 발현 조절 인자) 및 질병 저항성 유전자 (INF- $\gamma$ , 인터루킨 -15)를 이용하여 제작된 발현 벡터를 사용하였다 (Table 8).

## 2) 생식선 카이메라 생산 및 발생된 자손 개체에서 유전자 검증

조성된 실험축에 대한 검정교배 및 유전자 검증 실험을 수행하였다. 검정교배를 수행 중인 실험축은 외래 유전자를 주입하여 생산된 실험축으로서 실험축 A와 실험축 B로 전체 326수이며, 생식선 카이메라는 전체 21수가 생산되었고, 이로부터 발생한 전체 자손 수는 2,000여수가 넘었다. 생식선 카이메라 21수로부터 주입한 원시생식세포에서 유래된 자손 수는 전체 472수 (Stock A; 455수, Stock B; 17수)가 생산되었다 (Table 9). 현재 실험축 A에 대한 검정교배는 종료하였으며, 실험축 B에 대한 검정교배만이 진행 중에 있다. 실험축 A에 대한 개체별 생식선 카이메라 효율은 Table 10과 같다. 카이메라 효율은 개체에 따라 최대 56.5%에서 최소 0.5%로 매우 큰 차이를 나타내고 있다. 즉, 생식선 카이메라 효율이 50%이상인 개체가 5수인 반면 10%가 안되는 개체 역시 7수로서 전체 평균 24.3%를 나타내고 있다. 이는 수용체 배자내 원시생식세포를 제거하는 과정 (sterilization)을 수행하지 않아 개체간의 균일한 결과가 도출되지 않고 효율 편차가 심한 것으로 사료된다. 그러나 이러한 효율은 개체간 다소의 차이는 존재하지만 현재까지 보고된 원시생식기내 원시생식세포를 이용한 생식선 카이메라에 비하면 월등하게 높은 효율이라 할 수 있다. 외래 원시생식세포를 주입한 전체 계군에 대한 생식선 카이메라 효율도 실험축 A의 경우 10%정도를 나타내었다 (Table 9). 이는 위에서 언급한 것과 같이 sterilization을 수행하지 않았으므로 전체 계군에 대한 다소 낮은 생식선 카이메라가 생산된 것으로 사료된다. 따라서 이를 병행하였을 경우에는 월

등하게 높은 전체 계군별 및 개체별 생식선 카이메라 생산 효율이 나올 것으로 예상된다. 현재 진행 중인 실험축 B의 경우에는 평균 3.17%이며, 개체별 21.21%에서 0.65% 효율을 나타내고 있다. 이러한 실험축 B의 경우 (카이메라 개체 평균 3.17%)는 실험축 A (카이메라 개체 평균 24.3%)에 비하여 생식선 카이메라 효율이 떨어지고 있음을 알 수 있다. 실험축 A와 B의 가장 큰 실험적인 차이는 공여체 (donor) 배자와 수용체 (recipient) 배자 계군을 서로 바꾸어 사용한 것이다. 즉, 실험축 A의 경우 공여체 배자로서 오골계를 사용하였으며, 수용체 배자로 화이트 레그혼을 사용하였고, 실험축 B의 경우에는 공여체 배자로서 화이트 레그혼을, 수용체 배자로 오골계를 사용하여 실험축 조성을 하였다. 따라서 본 실험 결과로 볼 때, 공여체와 수용체 배자의 계군에 따라 생식선 카이메라의 효율의 차이가 있었다. 이는 각각의 계군에 따라 이종간 원시생식기내로의 이동 능력이나 이동 후 원시생식기내에서의 분열·분화에 상호 적합성에 차이가 있는 것으로 사료된다. 따라서 생식선 카이메라의 최적 조건을 위해서는 공여체 배자로 오골계, 수용체 배자로 화이트 레그혼을 사용하는 것을 확립하였다. 또한 현재 이러한 조건으로 새로운 실험축 조성을 계속하여 진행 중에 있다.

또한, 본 실험을 통하여 생산된 카이메라의 경우 깃털 색이 다른 양상을 나타내었다. 실험축 A의 경우, 공여체로 오골계를 사용하였기 때문에 생식선 카이메라의 자손으로 생산된 개체는 순수한 오골계가 생산되어야 한다. 그러나 생식선 카이메라의 자손은 깃털 색에 있어서 순수한 오골계가 아닌 3가지 형태를 나타내었다. 즉, 순수한 오골계 형태와 회색 깃털 색의 오골계 및 줄무늬 형태의 오골계가 나타났다. 따라서 이는 오골계의 원시생식세포가 화이트 레그혼의 생식기에서 분열·분화하는 과정 중에서 원래의 특성이 어느 정도는 변화됨을 알 수 있다. 이러한 현상을 유추할 수 있는

Table 9. The efficiency of germline chimerism.

Stock		No. of test-cross	No. of germline chimera	Efficiency of chimerism (%)
Stock A	♂	62	6	9.7
	♀	84	8	9.5
	total	146	14	9.6
Stock B	♂	68	6	8.8
	♀	112	1	0.9
	total	180	7	3.9
Total		326	21	6.4

Table 10. The individual germline chimerism efficiency of experimental stock A.

	vectors	Donor-derived progeny no.	total no. of hatched chicks	germline chimerism (%)
Stock A	Mar-CMV-INFY(♂) #1	14	25	56.0
	Mar-CMV-INFY(♂) #17	77	144	53.5
	Mar-CMV-INFY(♂) #16	2	383	0.5
	Mx-INFY(♂) #32	156	305	51.1
	Mx-INFY(♂) #27	6	334	1.8
	Mx-INFY(♀) #43	27	65	41.5
	Mx-INFY(♀) #44	1	93	1.1
	Mx-INFY(♀) #34	1	45	2.2
	Mx-INFY(♀) #40	2	88	2.3
	C4 (♂)	1	16	6.3
	C4 (♀)	38	98	38.8
	C8 (♀)	76	149	51.0
	C1 (♀)	52	92	56.5
	C5 (♀)	2	37	5.4
	Total	455	1,874	24.3



가장 가능성 있는 가설은 유전자 각인 (genomic imprinting)으로 사료된다. 오골계의 원시생식세포가 화이트 레그혼의 생식기에서 분화와 성숙되는 과정 중에 화이트 레그혼의 유전자 각인 양상을 가지게 되어 각각의 깃털 색이 나타나는 것으로 예상된다. 그러나 이를 위한 정확한 기작 및 원인 구명을 위해서는 좀 더 많은 연구가 진행될 것으로 사료되며, 이러한 연구의 결과는 아직까지 밝혀지지 않은 조류의 성세포 분화에 있어서 기초 데이터를 제공할 수 있는 중요한 실험축이라 생각된다.

#### 나) 유전자 도입 개체의 생산 및 개량

##### 1) 질병저항성 유전자 도입 개체 자손 생산

위에서 언급한 것과 같이 현재까지 생산된 생식선 카이메라 자손에 대한 외래 유전자 전이 여부 검증 실험을 진행시켰다. 우선적으로 각 개체에 대한 genomic DNA 추출을 완료하였으며, vector DNA에 대하여 최적화 (optimization)된 primer를 이용한 PCR을 수행하였다 (Figure 35). 각각의 vector에 대한 프라이머는 최소 2종 이상을 사용하였으며, 2회 이상 반복하여 실험을 수행하였다 (Figure 36). 그러나 실험축 A의 생식선 카이메라 자손 455수에 대한 1차 PCR에서는 외래 유전자를 검출하지 못하였다. 이는 현재의 외래 유전자 검출 방법상의 문제점 또는 가금에 있어서 제기되는 유전체내로의 안정적인 외래 유전자 삽입 등이 문제인 것으로 사료된다. 따라서 전자의 문제 해결을 위하여 전 계군에 대한 DNA 재추출, PCR primer 제작성 및 조건 확립 중에 있으며, 이에 대한 Southern blotting을 이용한 검색 실험을 진행 중에 있다. 또한 생산된 개체에 대하여 외래 유전자 검출을 위한 방법으로 PCR, DIG 및 방사선 동위원소를 이용한 Southern blotting 등 다양한 방법을 이용한 외래 유전자 검출 방법을 확립 중에 있다. 두 번째 문제 해결을 위해서는 세포주 (SL-27, DT-40, CEFs;

닭배자 섬유아세포)를 이용하여 조류에 있어서 외래 유전자의 유전체내 안정적 전이 (stable integration)가 가능한지 여부를 추가적으로 검증하고 있다. 따라서 본 실험에 의하여 외래 유전자 전이 효율 계산이 가능할 것으로 예상된다.

실험축 B에 대한 외래 유전자 검증을 생식선 카이메라 및 생산 자손에 대하여 수행하였다. 우선, 생식선 카이메라 두 개체와 생식선 카이메라 자손에 대하여 PCR을 이용한 외래 유전자를 검색하였다. 실험 결과, 생식선 카이메라 자손에서의 외래 유전자는 검출되었으며 (Figure 37A), 수컷 생식선 카이메라의 정자 DNA를 이용한 PCR 검색으로도 외래 유전자가 검출되었다 (Figure 37B). 정자의 DNA 검색 결과를 벡터 DNA를 이용하여 band density를 비교하였을 경우 0.28% 효율을 나타내었다. 따라서 단순한 산술적 계산에 의하면 360마리의 생식선 카이메라 자손에 대하여 한 마리의 형질전환 개체를 생산할 수 있게 된다. 그러나 실험축 B의 경우, 예상과 달리 생식선 카이메라 효율이 낮아 (위에서 언급한 바와 같이 공여체 및 수용체 배자의 계군의 차이) 형질전환 개체 생산을 위해서는 좀더 많은 검정 교배를 위한 교배가 있어야 할 것으로 사료된다. 또한 단순한 PCR 결과에 의한 비교는 PCR 조건, DNA 상태 및 PCR 기기 등의 요인에 의하여 정확한 비교는 어렵다. 따라서 실험축 B의 생식선 카이메라에서 PCR에 의해 검출된 자손의 경우, 명확한 방법인 Southern blotting 및 Dot blotting을 실시하고 있으며, 현재 F<sub>2</sub>를 생산하여 좀더 정확한 분석을 진행 중에 있다. Control vector DNA에 대한 Southern blotting 조건은 10pg까지 검출 가능하였다.

## 2) 질병저항성 유전자 도입 개체 선발

위에서 언급한 것과 같이 현재까지 생산된 생식선 카이메라 자손에 대한

외래 유전자 전이 여부를 검증 실험을 진행하고 있으며, 형질전환 도입 개체가 생산될 경우 교배 조합 등을 통하여 안정적인 외래 유전자 삽입 개체 선발 및 계통 조성이 가능할 것으로 사료된다.

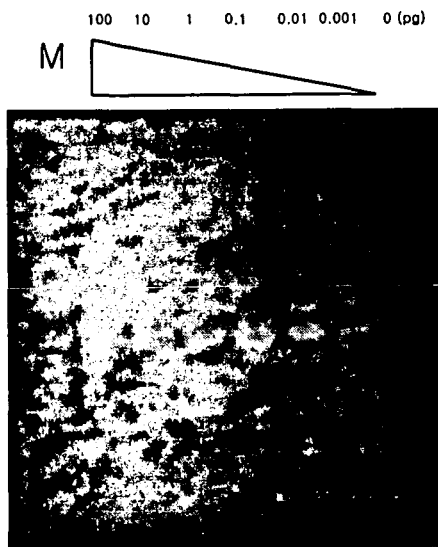


Figure 35. Optimization of PCT for transgene detection. The template DNA was serially diluted to 1 fg. PCR condition was as follows; for denaturation 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, for extension 72°C 10 min.

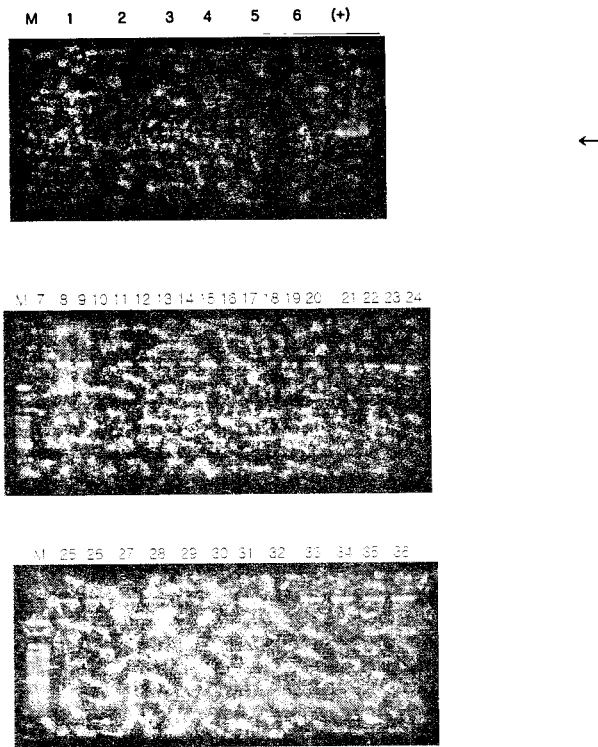


Figure 36. PCR screening of transgene for pMx-IFN- $\gamma$ . An arrow indicates the amplified chIFN- $\gamma$ .

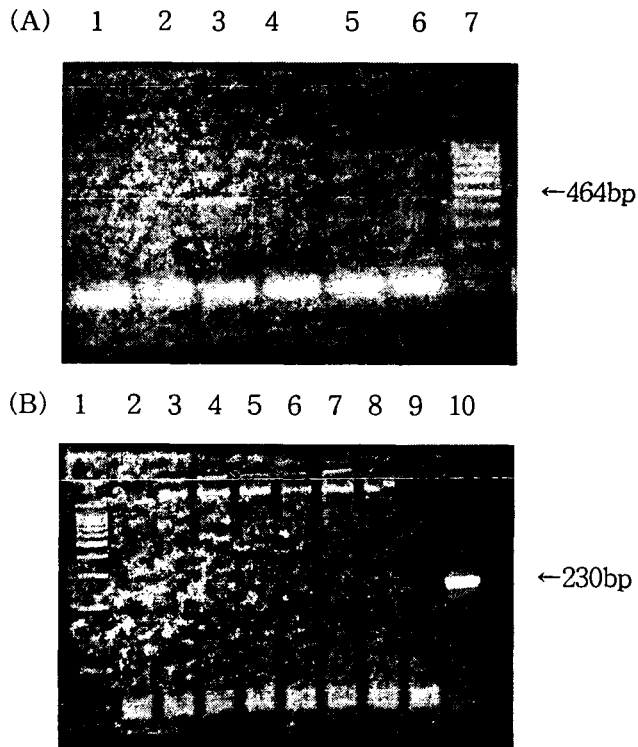


Figure 37. PCR screening of transgene for reporter gene (Neo<sup>R</sup> gene).  
(A) Screening of founder sperm genomic DNAs. The positive signal was detected in lane 3 showing 464bp fragment. (B) Screening of F<sub>1</sub> progenies by PCR. The positive signal was detected in lane 1. PCR product shows 230bp fragment (size marker; 100bp ladder).

## 제 4 장 체외 배양 시스템 개발 및 활용

본 장에서는 닭의 수정란의 체외 조작을 위한 체외 배양 시스템 개발과 이를 이용한 배자 조작에 관한 연구를 수행하였다. 이는 조류의 가장 큰 특징인 난(卵)으로부터의 발생을 이용하여 보다 효율적인 형질전환 개체 생산 및 실험 모델 체계 구축을 위하여 수행하였다.

### 제1절 체외 배양 시스템 개발

#### 1. 체외 배양시 환경 조성

체외 배양 시스템을 조성하기 위하여 우선 조건의 변화없이 닭의 난각을 이용한 메추리의 부화 실험하였다. 조건의 변화없이 대리난각을 이용한 실험에서는 메추리의 수정란을 직접 전이함으로써 부화율을 측정하였다. 대리 난각으로 전이 후 밀봉은 멸균 랩을 난백으로 접착하는 방법을 최적 조건으로 확립하였다. 부화실 조건은 본 연구실에 확립된 부화 온도 37.5℃, 부화습도 70%로 하여 수행하였으며, 실험 결과 평균 8.2%의 낮은 부화율을 보였다. 따라서 대리난각을 이용한 최적의 조건을 확립하기 위하여 여러 조건을 변화시키며 실험을 수행하였다. 전란각도에 의한 대리난각의 부화율을 측정하기 위하여 무전란, 전후 45°, 30°, 15°씩 하여 실험을 수행하였다. 실험 결과 전란각도 전후 15°(전체 30°)에서 높은 부화율을 나타내어 대리난각을 이용한 체외 배양시스템의 최적의 전란각도로 확립하였다. 전란 시간에 따른 배자의 영향을 알아보기 위하여 전란 횟수를 24시간, 12시간, 6시간에 한 번씩 하여 실험한 결과를 볼 때 6시간에 한 번씩 전란하는 조건이 가장 좋은 부화율을 나타냈다. 배자를 대리 난각으로 전이하는 방법으로는 직접 전이하는 방법과 멸균 랩을 이용한 방법이 이용되었으나 랩을 이용하는 경우에는 과정이 번거롭고 난백의 손실이 많아 적합하지 않

왔다. 따라서 본 연구실에서는 배자를 대리난각내로 직접 전이하는 방법을 조건으로 확립하였다. 랩을 사용할 때에는 부화 2-3일전에 랩을 제거하고 페트리 디쉬를 덮어줌으로써 병아리의 폐호흡을 도와줄 수 있는 조건을 확립하였다.

## 2. 체외 배양액 개발

배양액에 대한 부화율 실험으로 각각 닭의 난백, 메추리 난백, 닭과 메추리의 난백 혼합액을 이용하여 실험을 수행하였다. 닭의 난각을 이용한 메추리의 체외 배양시스템의 배양액 확립에 있어서는 메추리의 난백을 배자와 같이 대리 난각으로 전이하여 이를 배양액으로 이용하면서 닭의 난백을 일정량 첨가해주는 방법이 최적 조건으로 확립되었다.

## 3. 1세포기 수정란 적출 시술법 개발

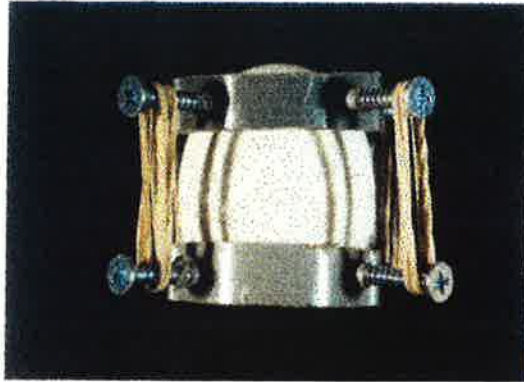
1 세포기 수정란은 닭의 난관으로부터 직접 일정한 시기에 적출해야 하기 때문에 닭의 산란과 배란 시기를 파악하는 것이 매우 중요하다. 따라서 현재 정확한 1세포기 수정란을 획득하기 위하여 서울대학교 농업생명과학대학 부속목장내 실험 계사에 보유중인 화이트레그혼 암닭에 대해 산란을 및 산란 시간을 매일 기록하였다. 기록에 의거하여 산란 후 바로 마취를 시킨 다음 복강을 절개하여 1 세포기 난포를 꺼낸 후 대리난각 (플라스틱 용기)에 전이 하였다. 전이 한 후 다른 알의 난백으로 채운다음 뚜껑을 닫고 배양을 실시하여 성공하였다 (Figure 38).

## 4. 대리난각공급을 위한 대량 멸균체제 확립

체외 배양시스템에서 이용할 대리 난각은 크기가 작은 오골계 난각을 70% 알콜로 소독을 한 후 절단하여 첨단부를 이용하였다. 절단된 첨단부



(A)



(B)



Figure 38. (A) Culture system of 1-cell stage embryos. (B) Culture of 1-cell stage embryos.

는 3차 증류수로 안쪽벽면에 있는 난백을 모두 제거한 후 마르지 않도록 주의하면서 멸균을 하였다. 둔단부의 경우 표면적이 너무 넓어 초기 배자가 난각에 흡착이 잘 안되어 초기 배자의 폐사율이 높아 대리난각에 이용하기에 부적합하였으며 난각의 크기 큰 것도 같은 이유에 의해서 사용하기에 부적합하였다. 따라서 대리 난각으로 이용할 난각은 작은 오골계의 첨단부쪽 난각이 가장 적합한 조건으로 확립하였다. 절단된 난각은 사용하기 전에 UV 램프 하에서 멸균 과정을 수행하였는데 10분 정도의 UV 조사로 충분한 멸균을 할 수 있었다.

## 제2절 체외 배양 시스템의 최적화

### 1. 체외 배양시 환경 조성

체외 배양 조건을 확립하기 위한 체계로 두 가지 시스템을 사용하여 실험을 수행하였다. 첫째는 메추리와 계란의 난각을 이용한 대리 난각 시스템의 효율 증진을 위한 실험을 수행하였으며, 둘째는 오골계와 화이트 레그혼을 이용한 대리난각 시스템 개발에 대한 실험을 두 가지로 수행하였다. 메추리와 계란의 난각을 이용한 시스템에서 실험구는 Table 11에 제시되어 있다. 각 실험구는 메추리의 수정란을 계란의 난각으로 전이시 첨가물을 다르게 함으로써 효율을 향상하려 하였다. 실험에 사용된 수정란과 발생을 그리고 일령별 생존율은 각각 Table 12와 13에 제시되어 있다. 표 12에서 보면 그룹 2가 다른 그룹에 비하여 높은 발생율을 나타내었으나 전체적인 발생율은 1-9%로 매우 저조한 결과를 나타내고 있다. 특히 Table 13의 일령별 생존율을 보면 4-5일의 초기 일령과 16-17일에 생존율이 급감하는 것을 알 수 있다. 4-5일령은 초기의 배자의 혈관이 난각에 부착되는 시점이므로 결국 메추리의 배자가 계란의 난각에 제재로 부착되지 못하고 있음을 알 수 있다. 이러한 현상은 정상의 수정란에서도 같은 일령에서

생존율이 크게 하락하는 것을 보이나 현 시스템에서는 매우 급격한 감소를 나타내고 있다. 따라서 이는 계란의 난각이 배자에 비하여 너무 크기 때문에 적절한 시점에서 난각에 혈관이 부착되지 못하고 실패하여 정상적인 배 발달을 하지 못하게 되기 때문으로 사료된다. 또한 17-18일령은 배자의 부화 단계시 생존율이 크게 떨어지는 것을 알 수 있는데 이는 폐호흡 유도나 막 제거등이 적절하지 못함을 나타내고 있다. 따라서 메추리와 계란의 난각을 이용한 대리난각 시스템에서는 첨가물보다는 전란 각도나 전란 속도 그리고 부화시 조건들이 더욱 중요한 요소임을 알 수 있다.

두 번째로 오골계와 화이트 레그혼을 이용한 대리 난각 시스템 개발을 수행하였다. 첫 번째 조건은 Table 14에 제시하였으며 결과는 Table 15에 제시하였다. 본 실험에서는 계란을 이용한 메추리의 대리난각 실험과 달리 상대적으로 매우 낮은 생존율과 부화율을 나타내고 있다. 그룹 간의 발생 단계별 생존율을 보면, 5일령에서는 그룹 3이 월등하게 높은 생존율을 나타내지만 10일령에서는 오히려 그룹 2, 4보다 생존율이 떨어지고 있으며, 10 일령 이후의 생존율이 크게 떨어져 부화율이 0~1% 정도로 매우 낮다. 이렇게 낮은 생존율의 원인은 완벽한 멸균 체계가 확립되지 않아 오염에 의한 원인과 전란각 또는 albumin의 추가 등이 배자 발달에 영향을 주어 생존율 및 부화율이 크게 떨어진 것으로 사료된다. 따라서 좀 더 발생 효율을 높이고자 다른 조건하에서 실험을 수행하였다. 오골계의 수정란과 화이트 레그혼의 난각을 이용한 두 번째 실험 조건은 Table 16에 제시하였으며, 실험 결과는 Table 17에 제시하였다.

Table 17의 결과를 보면 평균 20%대의 비교적 높은 부화율을 보이고 있다. 그룹 2가 27%로 가장 높은 부화율을 나타내어 대리난각 시스템의 안정적 체계로 확립하였다. 첨단부에 window를 내는 것은 가장 저조한 부화율을 나타내었고 둔단부에 window를 내어 기공막을 제거하여 사용하는 것

이 가장 좋은 효율을 보였다. 또한 set I와 달리 70% 알콜 소독이나 멸균 처리된 PBS 사용 등에 의한 멸균 체계 확립도 어느 정도의 부화율을 향상할 수 있는 요소가 된 것으로 생각된다. 밀봉시 랩을 사용하는 것보다 Whatman sealing paper로 2회 밀봉하는 것도 배자의 안정적인 배발달을 유지할 수 있었으며 발생 직전에 배자의 폐호흡을 유도하기 위한 30mm 페트리 디쉬를 사용한 것도 부화 전후의 생존을 향상을 가져온 것으로 생각된다. 따라서 본 연구실은 현재 평균 30%정도의 부화율 조건을 확립하였다.

### 제3절 체외 배양 시스템을 이용한 배자 미세 주입

#### 1. 체외배양 중의 배자에 미세주입법 개발

##### 가. 배자내 미세주입법 개발

배자내 미세주입을 위하여 기존에 본 연구실에서 확립된 배자 혈관내 미세주입과 더불어 배반엽 세포층내 미세주입법을 개발하였다. 본 실험은 체외 배양을 통하여 리포솜과 외래 유전자의 혼합액을 배자에 직접 주입함으로써 형질전환 개체 생산 성공 여부를 검증하기 위하여 수행되었다. 본 실험 전에 예비실험으로써 초기 배반엽 세포층에 원시생식세포 배양액을 주입함으로써 발생율을 확인하였다. 즉, 수정란의 옆 부위에 난각을 파각한 후 배반엽 세포층을 미세조작 한 후 밀봉하여 발생율을 측정하였다. 그러나 예비 실험 결과 발생율은 6.8%로 매우 낮은 효율을 나타내었다 (Table 18). 배반엽 세포층에 조작을 가했을 경우 배자 초기의 생존율에는 크게 영향을 미치지 않으나 부화 단계에 이르러서 대부분의 배자들이 파각을 하지 못하여 죽는 현상이 나타났으며 (Table 18), 부화한 개체일지라도 상당수가 약추로 발생하였다. 이러한 배반엽 세포층 주입 기법에 의한 개체 발생율은 현재까지도 세계적으로 10-30%내외의 낮은 부화율을 보이고 있다.

Table 11. The experimental design using quail and chicken egg shell.

처리구	
group 1	메추리 수정란을 계란의 난각에 그대로 전이
group 2	메추리 수정란 전체를 전이 후 계란의 난백 2ml 첨가
group 3	메추리 수정란중 난황만 전이 후 계란의 난백 7ml 첨가

Table 12. Experiment number and viability of three treatments.

	Egg number	Fertilized eggs	No. of hatched chick	Hachability
Group 1	120	77	1	1 %
Group 2	120	75	7	9 %
Group 3	120	28	1	4 %

Table 13. Survival ratio of three treatment using quail and chick egg during embryo development.

group day	group 1		group 2		group 3	
	developing embryos /fertilized eggs	%	developing embryos /fertilized eggs	%	developing embryos /fertilized eggs	%
3	69/77	90	71/75	95	26/28	93
4	47/77	61	55/75	73	18/28	64
5	41/77	53	51/75	68	15/28	54
6	33/77	43	42/75	56	11/28	39
7	28/77	36	34/75	45	11/28	39
8	28/77	36	32/75	43	10/28	36
9	26/77	34	30/75	40	10/28	36
10	23/77	30	30/75	40	10/28	36
11	22/77	29	29/75	39	10/28	36
12	21/77	27	29/75	39	10/28	36
13	20/77	26	26/75	35	10/28	36
14	17/77	22	26/75	35	10/28	36
15	15/77	19	25/75	33	7/28	25
16	14/77	18	23/75	31	4/28	14
17	12/77	16	18/75	24	4/28	14
18	1/77 (hatch 1)	1	7/75 (hatch 7)	9	1/28 (hatch 1)	4

Table 14. The conditions of surrogate system for Ogot and White Leghorn (Set I).

조 건	
동일조건	<ul style="list-style-type: none"> <li>- egg shell의 둔단부 제거, 내용물을 비우고 dentist drill로 2.5cm 정도의 구경이 되도록 window를 낸다.</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O로 egg shell을 세척</li> <li>- UV cross linker로 2분간 sterilization</li> <li>- 핀셋으로 donor egg shell에 window를 내고 조심스럽게 recipient egg shell에 옮긴다.(donor와 recipient의 난중이 10~15g 정도 차이가 나도록 조정)</li> <li>- plastic ring과 elastic band로 고정</li> <li>- 발생 2일 전 wrap에 천공, 발생 12시간 전 film을 petridish로 대체</li> </ul>
group 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- thin albumen을 3ml정도 첨가하고 thin albumen으로 wrap sealing</li> <li>- 3일간 전란각 90° 로 배양 후 30° 로 전환</li> </ul>
group 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 첨단부에 window, albumin을 가득 채움</li> <li>- 3일간 둔단부가 위로 오도록 전란각 90° 로 배양 후 뒤집어서 전란각 30° 로 배양</li> <li>- 이하 동일</li> </ul>
group 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 첨단부에 window, albumin 3ml 첨가</li> <li>- 3일간 둔단부가 위로 오도록 전란각 90° 로 배양 후 뒤집어서 전란각 30° 로 배양</li> <li>- 이하 동일</li> </ul>
group 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 둔단부에 window, albumin 3ml 첨가</li> <li>- 처음부터 전란각 30° 로 배양</li> </ul>



Table 15. Survival ratio of three treatment using Ogol and W.L egg during embryo development (set I).

	group 1	group 2	group 3	group 4
5 days	58/123 (47%)	37/94(39%)	132/187(71%)	44/104(42%)
10 days	12/123(10%)	12/94(13%)	21/187(11%)	14/104(13%)
15 days	3/123(2%)	3/94(3%)	7/187(4%)	5/104(5%)
hatch	0/123(0%)	0/94(0%)	1/187(0.5%)	1/104(1%)

Table 16. The conditions of surrogate system for Ogol and White Leghorn (Set II).

조    건	
동일조건	<ul style="list-style-type: none"> <li>- egg shell을 70% 알콜로 충분히 소독</li> <li>- egg shell의 둔단부 제거, 내용물을 비우고 dentist drill로 2.5cm정도의 구경이 되도록 window를 낸다.</li> <li>- 무균상태에서 egg shell을 PBS로 세척</li> <li>- UV cross linker로 2분간 sterilization</li> <li>- Whatman sealing paper로 두 번에 걸쳐 밀봉</li> <li>- 부화기에서 전란각 30°, 37.5℃, 60% 습도에서 배양</li> <li>- 발생 2일 전 wrap에 천공, 발생 12시간 전 film을 petridish로 대체</li> </ul>
group 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3일 동안 자연적으로 배양된 배자의 대리난각으로 전이</li> <li>- 둔단부에 window</li> <li>- 둔단부가 위로 향하게 배양</li> </ul>
group 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2일 동안 자연적으로 배양된 배자의 대리난각으로 전이</li> <li>- 둔단부에 window</li> <li>- 둔단부가 위로 향하게 배양</li> </ul>
group 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3일동안 자연적으로 배양된 배자의 대리난각으로 전이</li> <li>- 첨단부에 window</li> <li>- 둔단부가 위로 향하게 배양</li> </ul>
group 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 일동안 자연적으로 배양된 배자의 대리난각으로 전이</li> <li>- 첨단부에 window</li> <li>- 첨단부가 위로 향하게 배양</li> </ul>
group 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 일동안 자연적으로 배양된 배자의 대리난각으로 전이</li> <li>- 둔단부에 window</li> <li>- 둔단부가 위로 향하게 배양</li> </ul>

Table 17. Survival ratio of three treatment using Ogol and W.L egg during embryo development (set II).

Treat	days				
	5 days	10 days	15 days	hatch	
group 1	viability	55/64	41/64	33/64	14/64
	(%)	86	64	52	22
group 2	viability	13/15	8/15	8/15	4/15
	(%)	87	53	53	27
group 3	viability	10/33	3/33	3/33	3/33
	(%)	30	9	9	0
group 4	viability	36/56	26/56	22/56	11/56
	(%)	64	46	39	20
group 5	viability	78/103	58/103	50/103	21/103
	(%)	76	56	49	20

Table 18. Survival and hatching rates of the manipulated chicken embryos

Total no. of manipulated embryos	No. (%) of embryos surviving after		No. (%) of hatched
	5 days	15 days	
114	86 (76.1%)	66 (58.4%)	8 (6.8%)

이는 배자 초기에 물리적 상처를 가함으로써 초기 배발달에는 영향을 미치지 않으나 결국 발생 단계에 있어서 영향을 미치는 것으로 생각된다.

#### 나. 체외 배양에서 유전자 도입법 개발

체외 배양에서의 유전자 도입법을 개발하기 위하여 초기 배발달 단계 (Stage X)에서 배반엽 세포층에 리포솜을 이용한 방법으로 외래 유전자를 도입하고자 하였다. 리포솜은 세포 배양시 유전자 전이에 사용되었던 lipofectAMINE (Gibco BRL)을 사용하였으며, 외래 유전자로는 CMV 프로모터에 Lac Z 유전자가 결합되어 있는 표지 유전자를 이용하였다. 배자는 위에서 확립한 방법으로 산란 직후의 수정란을 옆으로 누여 실온에서 하루 정도 정치시킨 후에 사용하였다. 외래 유전자 주입 후 유전자 발현 양상을 검증하기 위하여 X-gal 염색을 수행하였다. 발현 검증을 위하여 전체 배자를 난황으로부터 조심스럽게 떼어낸 후에 PBS로 2회 세척하여 1% glutaraldehyde에서 5분간 고정하였으며, PBS로 2회 세척 후 X-gal을 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-4시간을 배양하여 발현 양상을 파악하였다. 유전자와 리포솜의 혼합비는 세포배양에서의 유전자 전이 방법을 이용하여 1:12 (W:W) 조건을 사용하여 2 $\mu$ g DNA에 12  $\mu$ l (24 $\mu$ g) 리포솜을 혼합하여 실온에서 30분간 정치시킨 후 하나의 배자에 약 5 $\mu$ l씩 배자의 배반엽 세포층 (blastoderm cavity) 사이에 마우스 파이펫을 이용하여 미세주입을 하였다. DNA와 리포솜 혼합액을 미세주입한 후 발현 양상 검증은 각각 1.5일령 배자 4마리, 2.5일령 배자 6마리, 3.5일령 배자 4마리, 4.5일령 배자 5마리, 5.5일령 배자 5마리를 시도하여 각각 2, 4, 3, 4, 3마리씩을 분석에 성공하였다. 분석한 결과, 총 6마리에서의 유전자 발현을 확인하였으며, 1.5일령 배자에서 1마리 및 2.5일령 배자에서 5마리가 확인되었다. 그러나 2.5일령 배자 이후에서는 유전자 발현은 확인하지 못하였다. 6마리의 발현 양상을 살

따르면, 5마리에서는 주로 혈관 등 extra-embryonic body에서 발현이 관찰되었으며, 한 마리에서만 배자내 머리 부분에서의 발현을 관찰할 수 있었다 (Figure 39).

Figure 39에 나타났듯이 대부분의 발현 양상은 배자이외 (extra-embryonic body)의 부분에서 관찰되었으며, 2.5일령 배자 한 마리에서만 Lac Z 유전자의 발현이 관찰되어 매우 낮은 유전자 전이 효율을 나타내고 있다. Figure 40에서는 배자이외의 부분에서의 Lac Z 발현중 혈관에서의 발현을 보여주고 있으나 이렇게 발현되는 세포들이 혈류에서 이동중인 원시생식세포인지는 확인되지 않았으며, 다만 이러한 세포들이 원시생식세포일 경우에는 손쉽게 생식선 형질전환 개체를 만들어 낼 수 있는 고효율의 방법이라고 생각된다. 그러나 대조구로 사용한 미세주입하지 않은 경우에는 배자의 어디에서도 Lac Z 발현이 관찰되지 않았다 (Figure 40D). 또한 76마리를 미세주입한 후 발생까지 유도하였으나 3마리만 발생하여 배자 조작으로 인한 극히 낮은 생존율을 나타내었다. 이는 위에서의 배양액을 미세주입하였을 경우보다 매우 낮은 부화율로써 유전자 전이로 인한 유전자 발현 및 리포솜에 의한 배자에 손상을 준 것으로 생각된다.

## 제4절 체외 배양 시스템을 이용한 레트로 바이러스 전이

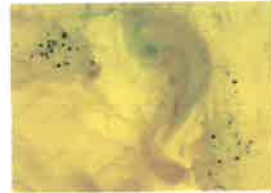
### 1. 체외배양 중의 배자에 레트로 바이러스 전이

위에서 수행한 체외 배양법을 이용한 유전자의 직접 전이 방법은 매우 낮은 유전자 전이 효율과 특히, 배자내 또는 원시생식기내 유전자 전이와 발현은 관찰되지 않았다. 이는 결론적으로 단순한 리포솜과 유전자의 혼합액 주입만으로는 배자내 효율적인 유전자 전이 및 안정적 발현을 유도할

(A)



(B)



(C)



(D)

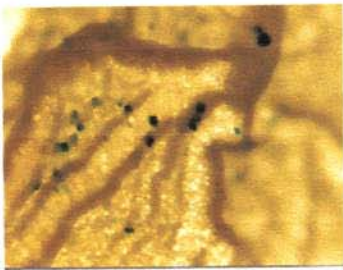


Figure 39. Detection of Lac Z expression. (A) and (B) Lac Z expression in extra-embryonic bodies (2.5-day-old). (C) Arrow indicates the expression of Lac Z in embryonic head (2.5day-old) (D) Control embryo that injected no DNA into blastodermal layer (2.5-day-old). No expression of Lac Z was observed.

수 없음을 제시하고 있다. 즉, 체외배양법을 이용한 효율적인 유전자 전이를 위해서는 보다 안정적인 체계의 필요성이 있다고 할 수 있다. 따라서, 본 연구실에서 레트로바이러스 벡터 시스템을 이용한 방법을 도입하여 가능성과 타당성을 검증하였다. 체외 배양법을 이용한 유전자 전이에 있어서는 레트로바이러스의 응용은 가장 효율적이며, 적합한 방법으로 사료되어 본 실험을 수행하였다. 사용된 레트로바이러스는 Molen cell line 유래 바이러스와 상업화되어 있는 293GP cell line 유래 pantropic 레트로바이러스를 검증하였다. Molen 유래 바이러스는 농축시키기 전의 titering 결과 NIH3T3 cell line에 대하여  $2 \times 10^7$  cfu/ml을 나타내어 상당히 높은 titering 수치를 나타내었다. pantropic 레트로바이러스는 NIH3T3에 대해서는 평균  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml, 닭배자 섬유아세포 (chicken embryonic fibroblast; CEF)에 대해서는  $10^3 \sim 10^4$  cfu/ml로 상대적으로 NIH3T3에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. 따라서, 보다 효율적인 유전자 전이를 위한 높은 titering을 얻기 위하여 ultracentrifuge를 이용하여 농축하여 사용하였으며, 이러한 농축에 의하여 바이러스 역가를 좀 더 높일 수 있는 조건을 확립하였다. 먼저 배양이 쉬운 Molen cell line 유래 바이러스를 가지고 ultracentrifuge 농축을 30회 이상 반복 실험을 시도하였다. 농축은 100배에서 최고 4,000배까지 시도하였다. 1,000배 이하의 농축에서는 농축전과의 유의성 있는 titering 증가가 나타나지 않았으며, 2,000배에서 4,000배까지의 농축 결과는 평균  $10^8 \sim 10^9$ 으로 높은 titering을 나타내었다. 이는 1,000배 정도는 농축 과정에서의 손실에 의한 유의성 없는 결과가 나타난 것으로 생각되며, 2,000배에서 4,000배 사이에서의 유의성 없는 결과는 2,000배 이상일 경우에는 실질적으로 바이러스를 너무 적은 양의 배지에 재부유시키는 과정에서 충분히 균일화되지 않거나 이러한 과정 중에 손실이 매우 큰 것으로 사료된다. 따라서, 본 실험 결과 2,000배 농축에서 가장 효율적인 titering 측정치와



(A)



(B)

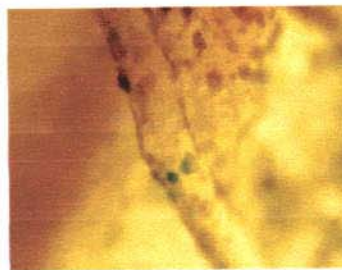


Figure 40. Detection of Lac Z expression in extra-embryonic bodies and blood vessels. A few cells in blood vessel were stained with X-gal. (2.5-day-old)

적정량을 얻을 수 있는 것으로 판단하고, 이를 이용한 배자 주입 실험을 시도하였다. 레트로바이러스 4 $\mu$ 를 6시간 pre-incubation한 배자의 blastodermal layer 사이에 주입 후 2.5일령 배자에서 *Lac Z* 발현을 검증하였다. 실험 결과 전체 배자에 걸쳐 전반적으로 발현되고 있음을 알 수 있었으며, 특히 머리, 꼬리 부분과 extraembryo 부위에 많이 나타났다 (Figure 41). 따라서 본 실험실에서 확립한 조건이 안정적으로 배자내 삽입이 되고 있음을 알 수 있었으며, 현재 이를 이용한 실험축 조성이 다음 세대로의 전달을 위한 원시생식기내의 발현 양상 검증과 성성숙 검정 교배를 통한 형질전환 개체 생산을 위한 실험을 계속 진행 중에 있다.

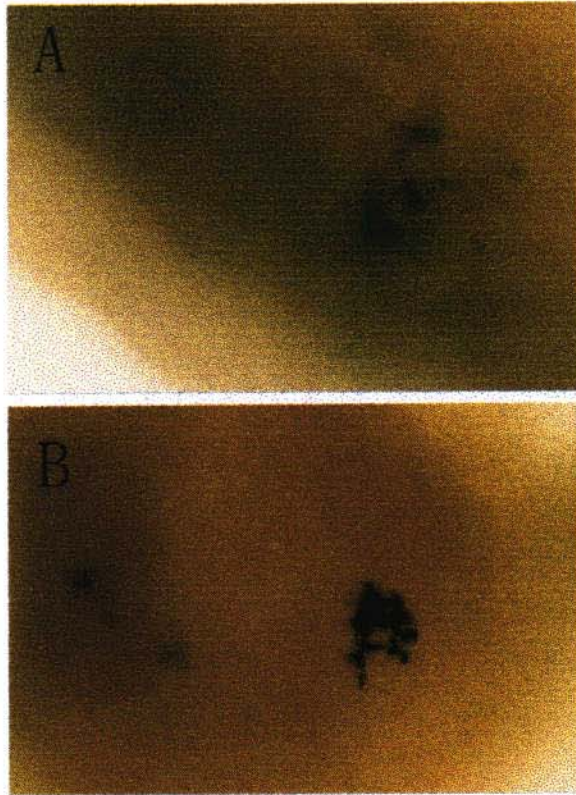


Figure 41. Expression of *Lac Z* in 2.5-day-old embryos. The concentrated retrovirus were injected into blastodermal layer of recipient embryos and whole embryos were screened for  $\beta$ -gal activity. A) embryo body, B) embryo head (200 $\times$ ).