

최 중
연구보고서

원시생식세포의 장기 배양 기법 확립
및 성장 촉진 닭의 효율적 생산에 관한 연구
In vitro Long-term Culture of Gonadal Primordial
Germ Cells and Transgenesis for the Growth
Improvement in Chicken

서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “원시생식세포의 장기배양 기법 확립 및 성장 촉진 닭의 효율적 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 10일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 한 재 용

협동연구책임자 : 권 세 창

연 구 원 : 신 영 수

연 구 원 : 신 훈

연 구 원 : 최 인 영

연 구 원 : 임 창 기

연 구 원 : 김 진 남

연 구 원 : 이 영 목

연 구 원 : 이 은 영

연 구 원 : 신 상 수

연 구 원 : 서 삼 렬

연 구 원 : 권 혁 모

연 구 원 : 이 경 주

연 구 원 : 김 윤 정

연 구 원 : 문 지 훈

요 약 문

I. 제 목

원시생식세포의 장기 배양기법 확립 및 성장 촉진 닭의 효율적 생산에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

형질전환 동물의 성공적인 결과는 기초 분야에서의 혁신적인 학문의 진보와, 응용 분야에 있어서의 무한한 이용 가능성을 제시하였다. 그러나 현재까지 형질전환 동물은 기초 학문 분야에서는 매우 다양하게 활용되어 왔으나 응용 분야에서는 다소간 제한적으로 활용되어 왔다. 이와 같이 형질전환 동물은 무한한 잠재적 가능성에도 불구하고 아직까지는 상업화할 수 있는 결과가 적으며, 닭의 경우에도 뚜렷한 결과는 없다. 그러나 형질전환 닭 생산 체계가 확립된다면, 성장 촉진 유전자에 의한 성장 촉진으로 사료비 감소와 빠른 출하 시기 등에 의한 생산비 절감 효과나 질병 저항성 유전자 전이에 의한 질병에 강한 품종 개발 및 생체 반응기 (bioreactor)를 이용한 계란 내의 유용 생의학 물질의 생산으로 농업을 고부가가치의 첨단 산업화로 꾀할 수 있을 것이다. 앞으로 형질전환 닭의 생산 및 산업화에 따른 파급 효과는 경제적·산업적으로 매우 클 것이며, 축산업의 경쟁력 강화뿐만 아니라 국제화, 첨단화를 이룰 것으로 전망된다. 즉, 우수한 능력을 가진 새로운 품종 개발은 생산비 절감과 비싼 외국 품종의 수입에 대한 외화 낭비를 줄일 수 있을 것으로 전망된다. 또한 본 연구에서 수행하고자 하는 원시생식세포의 장기 배양 및 계대 배양은 그 응용성뿐만 아니라 성세포의 분열, 성장, 분화의 기작과 성분화 과정을 밝혀 낼 수 있는 기초 학문 자료를 마련할 수 있을 것이다.

가축에서 우수한 능력을 가진 개체의 선발은 오랜 기간동안 농업에서 가장 중요한 주제였으며, 이러한 개체 선발에 많은 부분을 전통적인 통계 방법에 의존해 왔다. 그러나 최근에 이르러 형질전환 동물의 생산과 더불어 단기간, 저 비용의 선발이 가능하게 되었다. 형질전환 동물 생산은 Palmiter 등 (1982)에 의해 수퍼 마우스가 성공적으로 생산된 이후 분자유전학, 세포발생공학 및 여러 첨단과학 기술의 지속적인 연구에 힘입어 끊임없는 발전이 이루어지고 있다. 지난 몇 년간 형질전환 동물 생산에 관한 수천 편에 이르는 연구 결과보고는 현재 세계적으로 형질전환 동물 생산에 얼마만큼 많은 연구와 지원이 이루어지고 있는지를 나타내는 단적인 지표가 될 것이다. 그러나 이러한 연구의 대부분은 마우스를 비롯한 소, 염소, 면양 등 포유류에 초점이 맞추어져 있다. 포유류는 어느 정도의 차이는 있기는 하지만 대

부분의 경우에 초기 수정란의 조작이 간편하고 기초 연구가 많이 되어 있어 손쉬운 접근이 가능하였기 때문이었다. 또한 마우스는 인위적으로 특정 유전자를 삽입 또는 제거하는 유전자 표적 (gene targeting) 기법이 확립되어 많은 기초 연구가 진행되고 있으며, 1996년에는 Johns Hopkins 대학에서 knock-out 기법에 의해 성장이 보통 마우스보다 매우 빠른 거대 마우스를 생산하기도 하였다. 그러나 가금의 경우에는 포유류와 달리 배자 발달을 위한 영양소 공급원을 모체를 대신하여 난 (卵)을 이용한다는 것과 수정란의 형태학적, 생리학적 특징 때문에 포유류에서 이용되고 있는 접근 방법으로는 성공적인 결과를 얻지 못하고 있다. 또한 닭을 포함하는 가금의 경우에는 생리적, 분자 유전학적 기초 연구가 활발하게 진행되어 있지 않은 실정이다. 특정 가금류는 한 세대가 매우 짧고, 많은 자손을 얻을 수 있는 장점 그리고 배자의 체외 발달로 인한 인위적 조작의 용이함에도 불구하고 아직까지 실험 동물을 위한 계통 조성도 되어 있지 않다. 따라서 가금류에 대한 활발한 기초 연구가 필요하며, 이에 대한 응용은 농업에의 직접적인 이용이 가능하여 앞으로 혁신적인 첨단 농업으로의 발전을 이룰 수도 있을 것이다. 본 연구는 원시생식세포 배양 기술 확립으로 가금의 기초 생리 기작, 특히 성세포의 분화 및 분열을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 배양 기술을 이용하여 유전자 표적을 수행할 수 있는 기초 자료를 확립할 수 있는 계기가 될 수 있기 때문에 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다. 또한 원시생식세포의 배양에 의한 높은 유전자 전이 및 유전체내 삽입과 이를 이용한 효율적인 생식선 카이메라의 생산으로 성장이 빠른 가금 품종의 개발은 앞으로의 농업에 대한 첨단 산업화를 가속시킬 것이다.

현재 국내의 경제적 상황은 매우 어려운 시점에 놓여져 있으며, 특히 이러한 대내·대외적 어려움은 농업의 기반을 흔들리게 하고 있다. 축산업의 경우 사료의 전량을 수입에 의존하고 있는 현 시점에서 사료값, 농업 기자재, 각종 약품의 폭등은 농가에 커다란 부담으로 다가서고 있다. 따라서 보다 고효율의 사료 개발, 보다 높은 사료 효율의 품종 개발, 보다 높은 질병 저항성을 가지는 계통의 개발만이 국제 경쟁력 강화를 꾀할 수 있을 것이며 앞으로의 국제 사회에서 국내 축산업이 살아남을 수 있는 방안이 될 것이며, 성장이 빠른 형질전환 닭 생산은 가금 산업의 효율의 극대화를 위해 반드시 확립되어야 할 기술이다. 국내에서 사육되어지고 있는 계군의 품종은 거의 수입종에 의지하고 있어 이러한 외국 품종의 수입에 의한 외화 손실은 매우 크다. 이에 우수한 품종의 개발은 국내 생산 품종의 이용에 의한 외화 대체 효과와 오히려 수출에 의한 장기적인 외화 획득 효과도 예상된다. 그리고 본 연구에서의 형질전환 닭 생산 체계가 확립되면 성장 촉진 닭 생산뿐만 아니라 이를 바탕으로 하여 고부가치의 유용 물질을 대량으로 생산할 수 있는 생체 반응기 (bioreactor)의 응용으로 파급 효과도 창출할 수 있다. 또한 원시생식세포 배양 기법 확립과 효율적 생식선 카이메라 생산에 의한 형질전환 닭 생산은 다양화되고 있는 소비자의 욕구 충족을 위한 다양한 품질의 닭 생산 및 기능성 닭 생산도 가능해질 수 있을 것이다.

현재 미국에서는 한해 전체 1/3에 해당되는 3,000,000마리의 소에 성장 촉진을 위한 재조합된 성장호르몬을 주입하고 있다. 단기간에 빠른 성장은 그만큼 경제적 이득으로 전환되기 때문이다. 형질전환 동물의 생산은 우수한 경제 형질을 가진 개체의 선발에 있어서 전통적 통계 육종학적 방법이나 재조합된 호르몬 또는 생화학 물질을 투여하는 방법보다 효율적이고 저비용으로 고부가가치를 창출할 수 있다. 위와 같이 앞으로의 국제 사회에서는 최고의 기술과 경제적 부가가치 창출에 의한 효율적인 생산 체계를 통한 산업적 이용에 응용할 수 있는 기술만이 살아남을 수 있다. 따라서 국토가 좁고 자원이 적은 국내 실정으로는 이러한 첨단 유전공학적 기법을 이용한 성장 촉진 가축을 생산하는 것이 생산비용 절감 및 외국으로부터 밀려오는 저가의 육류 생산품에 대하여 가격 경쟁력을 유지하면서 산업 구조의 안정화를 도모할 수 있을 것이다. 또한 원시생식세포 배양 기술 및 형질전환 닭 생산 체계의 확립은 고부가치의 유용 물질을 대량으로 생산할 수 있는 생체 반응기 (bioreactor)에 응용될 수 있어 농업, 약학, 의학 분야 등에 다양한 산업적 파급 효과도 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 원시생식세포 장기 배양 기법 확립 및 생식세포주 (Embryonic germ cell; EG cell) 체계 확립
 - 배양액에 따른 원시생식세포 체외 배양
 - 기저 세포에 따른 원시생식세포 체외 배양
 - 성장 인자에 따른 원시생식세포 체외 배양
- (2) 형질전환 개체 생산을 위한 벡터 개발
 - 닭 성장 호르몬 (cGH)과 수용체 (cGH receptor) 유전자 확보
 - 성장 호르몬 분비 호르몬(GHRH) 유전자 확보
 - insulin-like growth hormone-1 (IGF-1) 유전자 확보
 - 유용 유전자 발현 promoter 확보 : β -actin, CMV, methallothionein
 - 유용 벡터 재조합
- (3) 원시생식세포의 초기 성판별 기법 확립
 - W 염색체 특이적 PCR 프라이머 확보
 - whole-blood direct PCR 조건 확립
 - 초기 배자 혈액의 PCR 기법에 의한 성판별 기법 확립

- (4) 원시생식세포내로 유전자 전이 조건 확립 및 발현 검증
- 원시생식세포내로 유전자 전이 조건 확립 (리포솜, electroporation 등)
 - 원시생식세포내의 유전자 발현 검증 (표지 유전자, 성장 촉진 유전자 등)
- (5) 백터의 *in vitro* 및 *in ovo* 발현 검증
- 세포주 (HeLa cell line, STO cell line)에서 *in vitro* 발현 검증
 - 백터의 배자내 주입에 의한 *in ovo* 발현 검증 (순수 DNA 주입에 의한 전이, 리포솜에 의한 전이)
 - 백터가 주입된 배자의 발달 단계에 따른 발현 양상 검증
- (6) 백터의 *in vivo* 발현 검증
- 백터의 성체 체내 직접 주입 (direct *in vivo* gene transfer) 조건 확립
 - 주입된 백터의 체내 발현 양상 검증
- (7) 생식세포주 (Embryonic germ cell; EG cell) 검증 및 분화 특성 구명
- 원시생식세포의 기저 세포에 따른 계대 배양 조건 확립
 - 생식세포주의 *in vitro* 검증 (PAS 염색, 원시생식세포 특이 항체에 의한 검증, 분화 양상 검증)
 - 생식세포주의 *in ovo* 검증 (생식세포주의 배자내 주입 및 초기 배자에서 분화 양상 검증)
- (8) 생식세포주의 *in vivo* 주입에 의한 특성 분석
- 생식세포주의 혈관내 주입
 - 생식세포주의 배반엽 세포층 (blastodermal layer)내 주입
 - 생식세포주의 생식세포로의 분화 검증
- (9) 생식세포주내로의 외래 유전자 전이 및 주입
- 생식세포주내로의 외래 유전자 전이 (리포솜, electroporation)
 - 생식세포주에서의 외래 유전자 발현 양상 검증
- (10) 생식세포주에 의한 생식선 카이메라 생산
- 생식세포주에 의한 생식선 카이메라 생산 및 후대 검증
 - 유전자를 전이한 생식세포주 주입에 의한 생식선 카이메라 생산

- (11) 형질전환 닭의 유전자 발현 분석
 - 후대 검정에 의해 생산된 개체에 대한 유전자 발현 분석
 - 형질전환된 닭의 외래 유전자의 안정적 삽입 분석

- (12) 성장 촉진 유전자 전이 닭 검증 및 증폭
 - 유전자가 전이된 닭의 표현형 분석 및 능력 검정
 - 유전자 전이 닭의 대량 증폭 및 계군 조성
 - 동형접합체(homozygous) 형질전환 유전자를 갖는 개체 확보

- (13) 성장 촉진 유전자 전이 닭 계통 조성
 - 형질전환 계군의 능력 검정
 - 형질전환 계군의 계통 조성

- (14) 형질전환 닭에서 전이 유전자의 발현 양상 분석
 - 형질전환 닭에서 전이 유전자의 발현 양상 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

외래 유전자를 삽입시킨 형질전환 마우스의 생산 기술은 고등동물에서 타생물체의 유전자를 도입시켜 발현시킬 수 있음을 입증한 것으로 이를 응용한 무한한 잠재적 가능성을 제시하고 있다. 이러한 방법은 생물학, 의학 등의 기초 및 응용 분야에 널리 이용되고 있으며, 가축에 있어서는 수의 질병의 모델, 의학적 유용 물질의 생산 및 유용 단백질의 변형을 위해 포유동물을 위주로 하여 활발한 실험들이 각국의 정부, 국공립연구기관, 사립연구소에서 막대한 지원을 바탕으로 생산 기술 확립을 위하여 박차를 가하고 있다. 닭을 비롯한 가금류의 경우에는 최근에 이르러 활발한 연구가 진행되고 있지만 기초 자료 부족과 접근 방법에 있어서의 어려움으로 아직까지 외래 유용 유전자를 도입시켜 산업화된 형질전환 닭은 보고되고 있지 않다. 따라서 국외 선도 그룹과의 격차가 거의 없어 이에 대한 지속적인 지원과 연구는 단시일 내에 국내 기술 수준을 세계적 수준으로 끌어올릴 수 있는 몇몇 안 되는 분야중 하나일 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

1. Establishment of chicken embryonic germ (EG) cells

Embryonic germ (EG) cell lines established from primordial germ cells (PGCs) are undifferentiated and pluripotent stem cells. To date, EG cells with proven germ-line transmission have been completely established only in the mouse with embryonic stem (ES) cells. We isolated PGCs from 5.5-day-old (stage 28) chicken embryonic gonads and established a putative chicken EG cell line with EG culture medium supplemented with stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-11 (IL-11), and insulin-like growth factor-I (IGF-I). These cells grew continuously for 10 passages (4 months) on a feeder layer of mitotically active chicken embryonic fibroblasts. After several passages, these cells were characterized by screening with the Periodic acid-Shiff's reaction, anti-SSEA-1 antibody, and a proliferation assay. The chicken EG cells maintained characteristics of gonadal PGCs and undifferentiated stem cells. When cultured in suspension, the chicken EG cells successfully formed an embryoid body and differentiated into a variety of cell types. The chicken EG cells were injected into stage X blastodermal layer and produced chimeric chickens with various differentiated tissues derived from the EG cells. Chicken EG cells will be useful for the production of transgenic chickens and for studies of germ cell differentiation and genomic imprinting.

2. The production of germline chimeras by transferring chicken EG cells

This study reported for the first time production of chicken germline chimeras by transfer of embryonic germ (EG) cells into recipient embryos of different strain. EG cells were established by culturing gonadal tissue cells of stage 28 White Leghorn (WL) embryos with I/I gene. Gonadal primordial germ cells (gPGCs) seeded with gonad stromal cells began to colonize 7 days after culture following significant ($p < 0.0001$) increase in cell population. Colonized gPGCs 10-15 days after primary culture were then subcultured with chicken embryonic fibroblast monolayer for EG cell preparation. As experimental

treatments, EG cells subcultured once or twice were transferred to stage 17 Korean Ogot chicken (KOC) embryos with i/i gene. After managed for sexual maturation up to 6 months, a testcross analysis by artificial insemination was conducted for evaluating germline chimerism. As results, EG cells transfer yielded total 2 germline chimeras out of 15 sexually matured chickens (13.3%). The efficiency of germline transmission in the chimeras was 1.5-14.6% in EG cells. In conclusion, chicken germline chimeras could be produced by transfer of EG cells derived from cultured gPGCs to recipient embryos and this might greatly contribute to establishing various innovative technologies in the field of avian transgenic research for growth improvement, disease resistance, and bioreactor production.

3. PCR Amplification for Sexing

Primers for sexing were designed based on W-chromosome specific regions. Primer set of CES#1/CES#2 amplified a fragment of 416bp and primer set of nCES#1/nCES#2 amplified a fragment of 348bp in female of both Ogot chicken for donor White Leghorn for recipient and but not in male. These primers were designed based on *Xho* I-repetitive sequence of W-chromosome. On W-chromosome of chicken, an 1,100bp (*Eco* RI family) sequence and a 717bp (*Xho* I family) sequence are repeated 6,000 and 14,000 times respectively. Primer set of QSEX#1/QSEX#2 amplified a fragment of 396bp on the region of W-chromosome, which is putative functional gene because this region contains splicing acceptor sequence and splicing donor sequence but the exact function is unknown. In dilution test of female and male genomic DNA, 1 ng of female genomic DNA could be detected but, even 300 ng of male genomic DNA could not be detected by PCR. These results show that these primers for sexing are very useful to distinguish between male and female of donor embryo. Although not confirmed yet, the mixed gPGCs of male and female embryo may affect the development of recipient gonads or germ cells after microinjection of manipulated gPGCs. Therefore, sexing of donor embryo is very important and indispensable pre-step for gPGCs manipulation.

It is very difficulty to be isolated genomic DNA from blood of donor embryo at stage 28 for sexing, because the amount of blood from 5.5-day-old embryo is very small and DNA extraction is time-consuming process. Therefore, Whole-blood direct PCR was performed. In whole-blood direct PCR method, blood sample from embryo was just boiled

before PCR thermocycles for sexing and there was no DNA extraction step. Blood sample was boiled at 97°C for 5 minutes and at 55°C for 5 minutes five times to break down cell membrane and release genomic DNA in sterilized PCR tube and then PCR thermocycles was performed, which resulted in the specific band only in female embryo.

4. Production of transgenic stocks by using pantropic retrovirus (LacZ & hGH)

This study was conducted to produce the transgenic stocks by using pantropic retroviral vector containing Lac Z as a reporter gene or human growth hormone (hGH) gene and to increase the efficiency of transgenesis through several technical approaches. For the expression and titering of hGH-retroviral vector, the concentration of hGH were compared in chicken embryonic fibroblast (CEFs) and NIH3T3 cells by ELISA. The hGH was produced 178.8±76.4ng/ml and 152.3±44.0ng/ml in CEFs and NIH3T3, respectively. The retrovirus then was injected into blood vessel of 2.5-day-old embryos and incubated until further next experiments. For screening of foreign transgene, polymerase chain reaction (PCR) and Southern blotting was conducted at 6, 12-days, and hatch after transfer of retrovirus. As a result of PCR and Southern blotting, hGH gene was detected in several embryonic tissues including the embryonic gonads, regardless of the embryonic developmental stages. Of total 29 analyzed, 19 individuals were positive to hGH gene sequence with 65.5% of transgenic efficiency. Thus, transgenic aves can be efficiently produced by using pantropic retroviral vector and increase the germline transmission of transgene by the microinjection of highly concentrated retroviral vector into blood vessel.

CONTENTS

(영문 목차)

SUMMARY	7
CONTENTS	10
Chapter 1. Introduction	15
1. Objectives and Significances	15
2. Contents and Scopes	16
Chapter 2. Experimental Results and Discussion	23
A. Equipments for transgenic stocks	23
1. Equipments of semi-SPF poultry house	23
2. Equipments for transgenic stocks	24
3. Equipments of experimental poultry house for transgenic stocks	25
B. <i>In vitro</i> culture of gonadal primordial germ cells (gPGCs)	26
1. Development of culture medium for gPGCs	26
2. <i>In vitro</i> culture of gPGCs isolated from the different embryonic stages	26
3. Development of feeder layer for gPGCs	27
4. Test of regulatory growth factors for gPGCs	29
5. Subculturing and characterization of EG cells	29
6. <i>In vitro</i> characterization of EG cells	31
(PAS staining, immunohistochemical assay, differentiation induction)	
C. Production of germline chimeras by transferring EG cells	40
1. Development of injection methods of EG cells into the recipient	40
2. Migration activity of EG cells after transferring into the recipient	41
3. Production of germline chimeras by transferring EG cells	41
D. Development of embryo sexing method	50

1. Development of embryo sexing method	50
2. Development of embryo sexing method at the early stages by direct PCR	51
E. Vector construction for growth improvement and analysis of vector expression <i>in vitro</i>	59
1. Growth-related genes and promoters for the regulatory expression	59
2. Vector construction	59
3. <i>In vitro</i> expression analysis in cell lines (Hela cell line, STO cell line).....	60
F. Gene transfer into gPGCs or EG cells and analysis of expression patterns <i>in vitro</i>	63
G. Direct <i>in vivo</i> gene transfer into the testis	69
H. Production of transgenic chickens (gPGCs/EG cells)	73
1. Production of germline chimeras after transferring the transfected gPGCs or EG cells	73
2. Expression analysis in transgenic chickens	73
I. Production of transgenic chickens by using pantropic retrovirus	76
1. Pantropic retroviral vector construction	76
2. <i>In vitro</i> expression analysis after infection of retrovirus in cell lines ..	76
3. Injection of the concentrated retrovirus into the recipient	76
J. Production of transgenic chickens for growth improvement	81
REFERENCES	107

목 차

제출문	1
요약문	2
I. 제목	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성	2
III. 연구 개발 내용 및 범위	4
IV. 연구 개발 및 활용에 대한 건의	6
 SUMMARY	 7
CONTENTS	10
 목 차	 12
제 1 장 연구개발과제의 개요	15
1. 기술적 측면에서의 필요성	15
2. 경제·사회적 측면에서의 필요성	15
3. 산업적 측면에서의 필요성	16
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	16
1. 지금까지의 연구 개발 동향 및 실적	16
2. 현 기술 상태의 취약성	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절 형질전환 개체 특수 사육을 위한 시설 구축	23
1. 준 SPF 계사 설비 설치	23
2. 형질전환 개체 특수관리를 위한 실험계사 설비 설치	24
3. 청정계사 시설 보완 및 소각로, 분뇨 처리 시설 보충	25
제 2 절 원시생식기 유래 원시생식세포 체외장기배양기법 확립	26
1. 배양액에 따른 원시생식세포 배양	26

2. 발생단계별 원시생식세포의 배양	26
3. 기저 세포에 따른 원시생식세포 배양	27
4. 성장 인자에 따른 원시생식세포 배양	29
5. 생식세포주 (EG cell) 계대 배양 및 분화 특성 구명	29
6. 생식세포주의 <i>in vitro</i> 검증 (PAS 염색, 항원검색, 분화양상 검증)	31
제 3 절 생식세포주에 의한 생식선 카이메라 생산	40
1. 생식세포주의 <i>in vivo</i> 주입 기법 확립	40
2. 생식세포주 주입에 의한 생식선 이동 능력 검증	41
3. 생식세포주 주입에 의한 생식선 카이메라 생산	41
제 4 절 초기 배자의 성판별 기법 확립	50
1. 원시생식세포의 초기 성판별 기법 확립	50
2. 초기 배자 혈액의 PCR 기법 의한 성판별 기법 확립	51
제 5 절 성장 촉진을 위한 효율적인 벡터 개발 및 발현 양상 검증	59
1. 닭 성장 관련 유전자 및 유전자 발현 프로모터 확보	59
2. 유용 벡터 재조합	59
3. 세포주 (Hela cell line, STO cell line)에서 <i>in vitro</i> 발현 검증	60
제 6 절 원시생식세포 및 생식 세포주내로 유전자 전이 및 발현 검증	63
1. 생식세포주로 유전자 전이 및 발현 검증	63
제 7 절 성계에 대한 체내 직접 주입 (direct <i>in vivo</i> gene transfer) 조건 확립	69
1. 벡터의 <i>in vivo</i> 발현 검증	69
제 8 절 형질전환 개체 생산 (원시생식세포/생식세포주)	73
1. 유전자를 전이한 원시생식세포 및 EG cell 주입에 의한 생식선 카이메라 생 산	73
2. 형질전환 닭의 유전자 발현 분석	73

제 9 절 레트로바이러스를 이용한 형질전환 개체 생산	76
1. 팬트로픽 레트로바이러스 (pantropic retrovirus) 발현 벡터 제작	76
2. 세포주내로 hGH 레트로바이러스 감염 및 titering 측정	76
3. 농축 레트로바이러스의 수용체 배자내 미세주입	76
제 10 절 레트로바이러스를 이용한 성장 촉진 형질전환 개체 생산	81
1. 성장 촉진 형질전환 개체 생산	81
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	101
1. 연도별 연구 목표	101
2. 평가 착안점 및 달성도	103
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획	105
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보	106
제 7 장 참고 문헌	107

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

1. 기술적 측면에서의 필요성

가축에서 우수한 능력을 가진 개체의 선발은 오랜 기간동안 농업에서 가장 중요한 주제였으며, 이러한 개체 선발에 많은 부분을 전통적인 통계 방법에 의존해 왔다. 그러나 최근에 이르러 형질전환 동물의 생산과 더불어 단기간, 저 비용의 선발이 가능하게 되었다. 형질전환 동물 생산은 Palmiter 등 (1982)에 의해 수퍼 마우스가 성공적으로 생산된 이후 분자유전학, 세포발생공학 및 여러 첨단과학 기술의 지속적인 연구에 힘입어 끊임없는 발전이 이루어지고 있다. 지난 15년간 형질전환 동물 생산에 관한 수 천편에 이르는 연구 결과보고는 현재 세계적으로 형질전환 동물 생산에 얼마만큼 많은 연구와 지원이 이루어지고 있는지를 나타내는 단적인 지표가 될 것이다. 그러나 이러한 연구의 대부분은 마우스를 비롯한 소, 염소, 면양 등 포유류에 초점이 맞추어져 있다. 포유류는 어느 정도의 차이는 있기는 하지만 대부분의 경우에 초기 수정란의 조작이 간편하고 기초 연구가 많이 되어 있어 손쉬운 접근이 가능하였기 때문이었다. 또한 마우스는 인위적으로 특정 유전자를 삽입 또는 제거하는 유전자 표적 (gene targeting) 기법이 확립되어 많은 기초 연구가 진행되고 있으며, 1996년에는 Johns Hopkins 대학에서 knock-out 기법에 의해 성장이 보통 마우스보다 매우 빠른 거대 마우스를 생산하기도 하였다. 그러나 가금의 경우에는 포유류와 달리 배자 발달을 위한 영양소 공급원을 모체를 대신하여 난(卵)을 이용한다는 것과 수정란의 형태학적, 생리학적 특징 때문에 포유류에서 이용되고 있는 접근 방법으로는 성공적인 결과를 얻지 못하고 있다. 또한 닭을 포함하는 가금의 경우에는 생리적, 분자 유전학적 기초 연구가 활발하게 진행되어 있지 않은 실정이다. 특정 가금류는 한 세대가 매우 짧고, 많은 자손을 얻을 수 있는 장점 그리고 배자의 체외 발달로 인한 인위적 조작의 용이함에도 불구하고 아직까지 실험 동물을 위한 계통 조성도 되어 있지 않다. 따라서 가금류에 대한 활발한 기초 연구가 필요하며, 이에 대한 응용은 농업에의 직접적인 이용이 가능하여 앞으로 혁신적인 첨단 농업으로의 발전을 이룰 수도 있을 것이다. 본 연구는 원시생식세포 배양 기술 확립으로 가금의 기초 생리 기작, 특히 성세포의 분화 및 분열을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 배양 기술을 이용하여 유전자 표적을 수행할 수 있는 기초 자료를 확립할 수 있는 계기가 될 수 있기 때문에 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다. 또한 원시생식세포의 배양에 의한 높은 유전자 전이 및 유전체내 삽입과 이를 이용한 효율적인 생식선 카이메라의 생산으로 성장이 빠른 가금 품종의 개발은 앞으로의 농업에 대한 첨단 산업화를 가속시킬 것이다.

2. 경제·사회적 측면에서의 필요성

현재 국내의 경제적 상황은 매우 어려운 시점에 놓여져 있으며, 특히 이러한 대내·

대외적 어려움은 농업의 기반을 흔들리게 하고 있다. 축산업의 경우 사료의 전량을 수입에 의존하고 있는 현 시점에서 사료값, 농업 기자재, 각종 약품의 폭등은 농가에 커다란 부담으로 다가서고 있다. 따라서 보다 고효율의 사료 개발, 보다 높은 사료 효율의 품종 개발, 보다 높은 질병 저항성을 가지는 계통의 개발만이 국제 경쟁력 강화를 꾀할 수 있을 것이며 앞으로의 국제 사회에서 국내 축산업이 살아남을 수 있는 방안이 될 것이며, 성장이 빠른 형질전환 닭 생산은 가금 산업의 효율의 극대화를 위해 반드시 확립되어야 할 기술이다. 국내에서 사육되어지고 있는 계군의 품종은 거의 수입 종에 의지하고 있어 이러한 외국 품종의 수입에 의한 외화 손실은 매우 크다. 이에 우수한 품종의 개발은 국내 생산 품종의 이용에 의한 외화 대체 효과와 오히려 수출에 의한 장기적인 외화 획득 효과도 예상된다. 그리고 본 연구에서의 형질전환 닭 생산 체계가 확립되면 성장 촉진 닭 생산뿐만 아니라 이를 바탕으로 하여 고부가치의 유용 물질을 대량으로 생산할 수 있는 생체 반응기 (bioreactor)의 응용으로 파급 효과도 창출할 수 있다. 또한 원시생식세포 배양 기법 확립과 효율적 생식선 카이메라 생산에 의한 형질전환 닭 생산은 다양화되고 있는 소비자의 욕구 충족을 위한 다양한 품질의 닭 생산 및 기능성 닭 생산도 가능해질 수 있을 것이다.

3. 산업적 측면에서의 필요성

현재 미국에서는 한해 전체 1/3에 해당되는 3,000,000마리의 소에 성장 촉진을 위한 재조합된 성장호르몬을 주입하고 있다. 단기간에 빠른 성장은 그만큼 경제적 이득으로 전환되기 때문이다. 형질전환 동물의 생산은 우수한 경제 형질을 가진 개체의 선발에 있어서 전통적 통계 육종학적 방법이나 재조합된 호르몬 또는 생화학 물질을 투여하는 방법보다 효율적이고 저비용으로 고부가가치를 창출할 수 있다. 위와 같이 앞으로의 국제 사회에서는 최고의 기술과 경제적 부가가치 창출에 의한 효율적인 생산 체계를 통한 산업적 이용에 응용할 수 있는 기술만이 살아남을 수 있다. 따라서 국토가 좁고 자원이 적은 국내 실정으로는 이러한 첨단 유전공학적 기법을 이용한 성장 촉진 가축을 생산하는 것이 생산비용 절감 및 외국으로부터 밀려오는 저가의 육류 생산품에 대하여 가격 경쟁력을 유지하면서 산업 구조의 안정화를 도모할 수 있을 것이다. 또한 원시생식세포 배양 기술 및 형질전환 닭 생산 체계의 확립은 고부가치의 유용 물질을 대량으로 생산할 수 있는 생체 반응기 (bioreactor)에 응용될 수 있어 농업, 약학, 의학 분야 등에 다양한 산업적 파급 효과도 기대된다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

1. 지금까지의 연구 개발 동향 및 실적

외래 유전자를 삽입시킨 형질전환 마우스의 생산 기술은 고등동물에서 타생물체의 유

전자를 도입시켜 발현시킬 수 있음을 입증한 것으로 이를 응용한 무한한 잠재적 가능성을 제시하고 있다. 이러한 방법은 생물학, 의학 등의 기초 및 응용 분야에 널리 이용되고 있으며, 가축에 있어서는 수의 질병의 모델, 의학적 유용 물질의 생산 및 유용 단백질의 변형을 위해 포유동물을 위주로 하여 활발한 실험들이 각국의 정부, 국공립연구기관, 사립연구소에서 막대한 지원을 바탕으로 생산 기술 확립을 위하여 박차를 가하고 있다. 닭을 비롯한 가금류의 경우에는 최근에 이르러 활발한 연구가 진행되고 있지만 기초 자료 부족과 접근 방법에 있어서의 어려움으로 아직까지 외래 유용 유전자를 도입시켜 산업화된 형질전환 닭은 보고되고 있지 않다. 따라서 국외 선도 그룹과의 격차가 거의 없어 이에 대한 지속적인 지원과 연구는 단시일 내에 국내 기술 수준을 세계적 수준으로 끌어올릴 수 있는 몇몇 안되는 분야중 하나일 것이다.

가. 성장 촉진을 위한 연구

우수한 경제 형질 능력을 가진 개체에 대한 선발은 농업 분야에서 오랜 기간동안 육종 목표로 설정되었다. 그러나 전통적인 통계 육종학적 방법은 많은 시간과 경비가 소비되는 것에 비해 능력 향상 비율이 그리 높지 않으며, 성장 호르몬과 같은 재조합 성장 촉진 인자의 투여에 의한 능력 향상은 부수적인 비용이 소요되며, 유전되지 않는다는 단점을 가지고 있다. 현재 미국에서는 소에 성장 촉진을 위한 재조합된 성장 호르몬을 주입하고 있으며, 가금에 있어서는 상업화된 예는 아직 없으나 최근에 IGF-1의 근육내 직접 주입 방법에 의해 성장 촉진 효과가 있다는 보고는 있다. 따라서 단시일 내에 저비용으로 우수한 경제 형질을 가진 개체 생산을 위하여 지난 몇 년 동안 많은 연구가 형질전환 동물 생산과 농업에서의 응용에 집중되고 있으며 (표 참조), 이와 같은 결과들은 축산에 있어 경제형질과 도체형질의 향상을 위한 방법으로 형질전환 동물 생산 기법의 적용 가능성이 매우 높다는 것을 제시해 주고 있으며, 아울러 가금에 있어서도 높은 성공 가능성이 있음을 기대할 수 있다. 가금의 경우에는 성장 촉진을 위한 형질전환 닭 생산이 아니라 형질전환 닭 생산에 대한 기초 연구가 아직 이루어지지 않은 상황이기 때문에 앞으로 이에 대한 지속적인 연구와 성공은 경제·산업 분야에 커다란 파급 효과를 가져올 것으로 예상된다.

나. 형질전환 닭 생산을 위한 연구

형질전환 닭 생산을 위한 연구는 최근에 전 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있으나, 닭은 포유류와 달리 수정란의 형태학적, 생리학적 특징 때문에 수정란 조작이 용이하지 않아 아직까지 뚜렷한 결과가 없는 상황이다. 따라서 형질전환 닭 생산에 있어서 문제를 극복하기 위하여 다양한 방법들이 시도되어지고 있다. 이러한 방법으로는 초기 수정란에 외래 유전자를 직접 미세주입하는 방법 (Love 등, 1994; Naito 등, 1994; Han 등, 1994), 초기 배자

표. 성장과 도체 형질 향상을 위한 농업에서의 형질전환 동물 생산에 관한 연구

종	조절 인자	외래 유전자	연구자	년도
돼지	mouse methallothionein promoter	human growth hormone	Hammer 등	1985
	human methallothionein promoter	porcine growth hormone	Vize 등	1988
	mouse methallothionein promoter	human GH releasing hormone	Brem 등	1988
	mouse albumin promoter	human GH releasing hormone	Pursel 등	1989
	mouse methallothionein promoter	human insulin-like growth factor	Pursel 등	1989
	bovine prolactin promoter	bovine growth hormone	Polge 등	1989
	mouse methallothionein promoter	human growth hormone	Pursel 등	1990
mouse sarcoma virus LTR	chicken SKI	Pursel 등	1992	
ovine methallothionein promoter	ovine growth hormone	Pursel 등	1997	
소	mouse mammary tumor LTR	bovine growth hormone	Roushlaou 등	1989
	chicken skeletal actin promoter	human oestrogen receptor	Wieghart 등	1990
	chicken skeletal actin promoter	human insulin-like growth factor	Hill 등	1992
양	mouse methallothionein promoter	human growth hormone	Hammer 등	1985
	mouse methallothionein promoter	bovine growth hormone	Rexroad 등	1989
	ovine methallothionein promoter	ovine growth hormone	Murray 등	1989
	mouse methallothionein promoter	human GH releasing hormone	Pursel 등	1989
	mouse transferrin promoter	bovine growth hormone	Rexroad 등	1991

의 배반엽 세포를 외래 유전자의 운반체로 이용하는 방법 (Brazolt 등, 1991; Watanabe 등, 1992; Carsience 등, 1993), 정자를 운반체로 이용하는 방법 (Gavora 등, 1991), 원시생식세포를 운반체로 이용하는 방법 (Tajima 등, 1993; Chang 등, 1995; Li 등, 1995, Ono 등, 1996; Han 등, 1997), 레트로 바이러스를 이용한 방법(Savva 등, 1991; Thoraval 등, 1995)등이 이용되었다. 그러나 초기 수정란에 미세주입 방법은 수정란을 암탉의 외과 수술에 의해 적출해야 하는 어려움과 개체 발생을 위하여 대리난각을 이용해야 하는 문제가 있으며, 배반엽 세포를 이용한 방법은 체세포 카이메라 효율은 높으나 생식선 카이메라 효율이 낮고 유전자 전이 방법이 확립되어 있지 않은 문제가 있다. 그리고 외래 유전자의 운반 매개로써 정자를 이용한 방법은 매우 단순하고 비용이 적게 들지만 유전자 전이 효율이 극히 낮다는 단점이 있다. 따라서 최근에 이르러 원시생식세포를 이용하는 방법이 매우 활발한 연구가 되고 있다. 원시생식세포를 이용한 방법은 현재까지 생식선 카이메라의 효율은 어느 정도 검증이 되었으나

유전자가 전이된 형질전환 닭 생산에 대한 보고는 아직 없다. 이는 원시생식세포의 세포학적, 생리학적 특징으로 인하여 유전자 전이 효율이 매우 낮으며 수용 개체의 유전체내로의 삽입이 검증되어 있지 않기 때문에 보다 많은 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

- 닭의 β -actin promoter와 Rous Sarcoma virus vector를 이용하여 초기 배자에서 외래 유전자의 전이를 확인 (Brazolt 등, 1991)
- 정자에 외래 유전자를 흡착시켜 인공 수정에 의한 유전자 전이 시도 (Gavora 등, 1991)
- reticuloendothelial virus를 이용하여 원시생식세포내로 유전자를 전이하였으며 이를 초기 배자에 주입한 후 10, 18일령 배자에서 외래 유전자 검출 (Savva 등, 1991)
- 닭과 메추리의 이종간 원시생식세포 전이 및 원시생식기내에서의 확인 (Watanabe 등, 1992)
- 12%의 생식선 카이메라 생산 효율을 보고 (Tajima 등, 1993)
- RSVLTR을 이용하여 자손에서 외래 유전자는 검색되었으나 episomal form으로 확인 (Love 등, 1994)
- 닭의 β -actin promoter를 이용하여 정자에서의 외래 유전자는 검색되었으나 자손에서는 확인되지 않음 (Naito 등, 1994)
- RSVLTR을 이용하여 1.5~4.5일령 배자에서 외래 유전자의 발현 검증 (Han 등, 1994)
- 원시생식세포의 체외 배양 및 원시생식기로의 이동 확인 (Chang 등, 1995)
- 레트로 바이러스 벡터를 이용하여 정자에서의 유전자 확인 (Thoraval 등, 1995)
- 메추리의 원시생식세포를 닭 배자에 주입한 후 원시생식기내에서의 존재 확인 (Ono 등, 1996)
- 5일 동안 체외 배양한 원시생식세포를 이용한 생식선 카이메라 생산 성공 (Han 등, 1997)

다. 원시생식세포 배양에 관한 연구

원시생식세포는 성세포 (정자 혹은 난자)의 전구세포로서 닭에 있어서는 배 발생 초기에 외배엽에서 발생하여 중배엽과 내배엽을 거쳐 germinal crescent로 이동한다. germinal crescent로 이동한 원시생식세포는 다시 혈관계를 따라 원시생식기로 이동하여 분열과 분화를 시작하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 원시생식세포의 체내에서의 이동이나 분열 등에 관여하는 요인이나 물질은 아직 명확하게 밝혀 있지 않은 상태이다. 체외 배양시 원시생식세포의 성장, 분열, 분화에 관여하는 인자에 관한 연구는 주로 마우스의 원시생식세포를 중심으

로 이루어져 왔다. DeFelici와 McLaren (1983)에 의해 처음으로 마우스의 원시생식세포의 체외배양이 시도되었으며, Resnick 등 (1992)이 마우스의 원시생식세포의 장기간 배양을 보고하였는데 steel factor와 leukemia inhibitory factor (LIF)가 원시생식세포의 생존과 분열에 관여함을 보고하였다. 특히, steel factor (stem cell factor, mast cell growth factor)는 인위적으로 배양액에 첨가하거나 SCF를 분비하는 somatic cell과 feeder cell을 사용함으로써 원시생식세포의 생존을 오랜 기간 유지할 수 있다는 보고도 있다 (Matsui 등, 1991; Dolici 등, 1991; Godin 등, 1991). 또한 basic fibroblast growth factor (bFGF)는 steel factor와 LIF의 존재 하에서 원시생식세포의 분열에 관여하고 있음을 보고하였고 (Resnick 등, 1992), DeFelici 등 (1993)은 forskolin이 원시생식세포의 분열을 촉진하는데 관여하는 intracellular cAMP의 수준을 증가시킴으로써 원시생식세포의 성장을 촉진함을 확인하였다. 이 밖에도 pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP (Pesce 등, 1996), tumor necrosis factor- α , TNF- α (Kawase 등, 1994), retionic acid (Koshimuzu 등, 1995) 등이 마우스에 있어서 원시생식세포의 생존과 분열에 관여하는 것으로 밝혀졌으며, 최근에는 interleukin-4 (IL-4)와 interleukin-11 (IL-11)이 원시생식세포의 수적인 증가에 관여하는 것으로 알려졌다 (Cooke 등, 1996). 그러나 닭의 원시생식세포의 배양과 성장에 관한 연구는 아주 미비한 편이며, 닭에 있어서는 avian stem cell factor (Zhou 등, 1993)와 proteoglycan chondroitin sulfate ABC (Bellin 등, 1985)가 닭의 원시생식세포의 성장과 분열에 영향을 미치는 것으로 보고되었을 뿐이다. Allioli 등 (1994)과 Chang 등 (1995)이 닭의 원시생식세포의 배양 성공을 보고하였으나, 일주일 이내의 아주 짧은 기간동안 배양한 것으로 성장인자들을 이용한 장기간 배양은 아직 연구가 없는 상태이다. 특히 지금의 추세는 단순한 원시생식세포의 배양에서 원시생식세포를 마우스의 배간세포화 (embryonic stem cell line)하여 embryonic germ cell line (EG cell line)을 확립하고자 하는 시도가 활발히 수행되고 있으며, 마우스에서는 원시생식세포의 계대 배양 및 생식선 카이메라의 성공을 보고하고 있다. 그러나 아직까지 마우스를 제외한 다른 동물에서의 생식선 카이메라의 성공은 없으며, 다만 돼지의 원시생식세포의 계대 배양과 이를 이용한 체세포 카이메라의 성공은 보고되었다 (Shim 등, 1997 ; Piedrahita 등, 1997). 닭의 경우에는 아직 원시생식세포의 계대 배양은 물론 단순한 장기간 배양의 보고도 없다. 그러나 닭은 배자를 쉽게 얻을 수 있고, 많은 수의 원시생식세포를 손쉽게 분리할 수 있기 때문에 앞으로 많은 연구가 빠르게 진행될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 원시생식세포의 장기 배양 및 EG cell line 확립에 대한 연구가 전 세계적으로 전무한 상황에서 이에 대한 지속적인 연구는 매우 시급하다고 할 수 있다.

라. 국내 연구 동향

○ 본 연구실 연구 동향

- 배양된 닭 배아 섬유아세포에서 리포솜과 electroporation의 방법에 의해 외래 유전자의 안정적 발현 확인 (Han 등, 1993).
- 배반엽 세포의 미세주입에 의한 화이트 레그혼과 오골계간의 체세포 카이메라 생산 (서 등, 1995)
- lacZ 유전자가 전이된 원시생식세포를 2.5일령의 배자의 혈관을 통해 주입하여 정소에서 lacZ 유전자의 발현 확인 (서 등, 1994)
- 원시생식세포를 단기간 배양하는 기법을 확립함 (Chang 등, 1997)
- 단기 배양된 오골계의 원시생식세포를 화이트 레그혼에 주입하여 개체를 생산하였으며, 후대검정을 실시하여 오골계의 원시생식세포에서 유래된 생식 세포에 의해 오골계의 표현형을 가지고 태어나 성공적으로 주입된 원시생식세포가 화이트 레그혼의 원시생식기로 이동하였음을 확인하였고 계속 검정 중에 있다.

○ 타 연구 기관의 연구 동향

본 연구실외에 닭을 연구하는 팀은 몇 그룹에 불과하다. 원시생식세포에 대한 연구는 고려대 이상호 교수팀에서 쥐의 원시생식세포 분리 및 배양에 대한 보고가 있으며 (이 등, 1994), 축산기술연구소에서 방란된 수정란을 이용한 대리난각 in vitro 배양 시스템에 대한 연구 (전 등, 1994)가 진행 중이며, 유전자를 주입하기 위한 연구가 진행 중에 있다.

2. 현 기술 상태의 취약성

가. 원시생식세포의 순수 분리 및 체외 배양

원시생식세포의 순수 분리는 Ficoll이나 Percoll을 이용한 방법들이 보고는 있으나 원시생식세포만을 고농축으로 분리할 수 있는 기술은 아직 보고되지 않고 있다.

나. 성장 인자에 따른 원시생식세포 분열 양상 검증

체내에서 원시생식세포의 분열, 증식 및 분화에 관여하는 성장 인자 또는 조절 인자는 많은 수가 존재할 것으로 추측된다. 그리고 현재까지 몇몇의 성장 인자가 체외 배양에서 성장과 분열에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직까지 원시생식세포의 장기 체외 배양 조건이 확립되지 않아 원시생식세포의 분열 양상의 정확한 기작에 대한 보고는 없다.

다. 초기 배자의 성 판별

원시생식세포의 성을 판별하는 것은 형질전환 닭 생산에 중요한 의미를 가지고 있다. 유전자 전이 후 원시생식세포의 미세주입시 반대의 성을 가진 원시생식세포가 원시생식기내

로 이동한다면 원시생식세포의 정상적인 분화, 발달에 영향을 미칠 것이기 때문이다. 그러나 아직까지 반대의 성을 가진 원시생식세포에 의해 원시생식기의 발달 혹은 원시생식세포 자체의 분화, 발달에 영향을 미치는 정확한 작용이나 기작은 밝혀지지 않았다.

라. 외래 유전자의 원시생식세포내 주입 및 발현 검증

원시생식세포는 생리학적, 형태학적 특징으로 인하여 외래 유전자의 전이 효율이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다. 따라서 형질전환 닭 생산을 위해 가장 시급히 극복해야 할 문제이며, 이러한 기술상의 문제만 극복된다면 형질전환 닭 생산은 머지않아 보고될 것으로 사료된다.

마. 원시생식세포의 계대 배양 및 장기 배양

원시생식세포의 체외 배양 체계는 일주일내외의 단기일에 대한 연구 결과는 보고되었으나, 아직까지 장기 배양이나 계대 배양의 보고는 전무한 상황이다. 따라서 아직까지 원시생식세포의 embryonic stem cell line (ES cell line)화, 즉 embryonic germ cell line (EG cell line)화에 대한 보고는 거의 없다.

바. 형질전환 닭 생산

현재 생식선 키메라 생산의 보고는 외국의 일부 그룹에서 성공한 예를 보고하고 있으며 본 연구실에서도 키메라 생산에 성공하였다. 그러나 원시생식세포를 이용한 유전자 전이 및 형질전환 닭 생산에 대한 보고나 외래 유전자의 수용체내 유전체내로의 삽입에 대한 보고 및 성장 촉진 형질전환 닭에 대한 보고는 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 형질전환 개체 특수 사육을 위한 시설 구축

본 과제를 수행하기 위한 준 SPF 계사 설비 및 청정 계사와 소각로와 분뇨 처리 시설을 완공하였다. 본 시설은 형질전환 개체의 외부 질병 감염 방지 및 외부와의 격리 수용을 위하여 육추, 중추, 성계사를 포함한 청정 계사의 신축으로, 생명공학 육성법 제 15조에 의한 『유전자 전환 가축의 격리 수용에 의한 외부 노출 방지와 합당한 적정 환기시설 설치 및 유전자 전환 가축의 실험 및 사양에 관련한 설비와 장치는 확실하게 구분하여 설치하여야 하며 형질전환 가축이 사육되어지는 시설은 별도로 설치되어야 한다.』는 취지하에 설비되었으며 아래와 같다.

1. 준 SPF 계사 설비 설치

본 과제를 수행하기 위한 준 SPF 계사 설비 설치를 계획대로 완료하였다. 연구기자재 및 시설비 항목으로 제일양계에서 관리, 공사를 수행하여 완료하였다. 본 시설은 기존의 성계사에 대하여 바닥, 천장 공사 및 외벽 공사를 수행하였으며, 온도 조절과 환기를 위한 공조 시설을 설치하였다. 총 수용수수는 육추시설로 252수분, 성계로 수탉 144수, 암탉 288수 규모로 설치하였으며, SPF 계사내 실험축 사육 조건을 위하여 육추 병아리와 중추, 성계 사육으로 기본적인 사육 조건을 확립하였다. 계사내 전체적인 온도 조절 및 환풍은 중앙 공조 시설에 의하여 조절되며, 육추실의 경우에는 별도의 육추기에 의하여 발생 초기의 온도 조절을 할 수 있게 하였다. 또한 점등 관리는 각각의 사육실마다 따로 설치하여 각각의 실험축에 대한 관리가 가능하도록 하였다. 준 SPF 계사 시설에 대한 구체적인 사항은 다음과 같다.

가. 계사 크기 :

5.7m × 15m (성계사), 5.7m × 3.6m (육성사)

나. 계사내 구조 변경 사항

1> 계사내 통로 설치 (길이 : 15m / 폭 : 1.2m)

2> 3개동의 성계사와 1개동의 육성사 :

4.5m × 5.0m (성계사 3동), 4.5m × 3.6m (육성사 1동)

다. 계사 내부 시설 설치 사항

1) 암탉 직립식 케이지 설치 : 4단 24조 96칸 설치 (× 3개동)

2) 수탉 직립식 케이지 설치 : 3단 24조 48칸 설치 (× 3개동)

- 3) 육성 직립식 케이지 설치 : 3단 18조 (× 1개동)
- 4) 분판, 급수 설치
- 5) 환기휀, 난방용 전기 난로 (육추실) 설치
- 6) 에어 커튼 설치 (방충 및 외부 공기 유입 차단)

라. 계사 작업 내용

- 1) 바닥 세멘 파기 분쇄 (약 20m)
- 2) 배수구 설치 (오수 처리건)
- 3) 창문(4), 하단 환기구(4), 출입문(2) 폐쇄 작업
- 4) 스투트 안쪽 (120m²) 폴리 우레탄 발포 작업
- 5) 바닥 작업 (잡석깔기, 와이어 메쉬, 콘크리트 타설, 에폭시 도포)
- 6) 내선공사 (전등, 콘센트, 배선, 타이머 등)
- 7) 급수라인 공사 (급수용, 생활용)
- 8) 천장 및 칸막이 공사 (75mm 인슈판넬)
- 9) 환기창, 출입문 설치
- 10) 콘크리트 벽면 도색 작업
- 11) 지붕위 도색 작업

2. 형질전환 개체 특수관리를 위한 실험계사 설비 설치

본 과제를 수행하기 위하여 형질전환 개체 생산 후, 특수관리를 위한 실험계사 설비 설치를 계획대로 완료하였다. 연구기자재 및 시설비 항목으로 제일양계에서 관리, 공사를 수행하여 완료하였다. 총 수용수수는 육추시설로 504수분, 중대추시설로 630수분, 성계로 수탉 432수, 암탉 576수 규모로 설치하였으며, 본 연구기관과의 협의에 의해 별도의 추가적인 변압기 및 발전시설 설비 공사를 하였다. 구체적인 사항은 다음과 같다.

가. 실험 계사 내부 크기 : 12M × 21M × 2.4M (76.4평)

- 1) 성 계 실 : 2.3m × 5.95m × 6실
- 2) 중대추실 : 1.7m × 2.50m × 5실
- 3) 육 추 실 : 1.7m × 2.50m × 4실

나. 실험 계사 내부 시설 설치 사항

- 1) 암탉 직립식 케이지 설치 : 4단 24조 96칸 설치 (× 6개동)
- 2) 수탉 직립식 케이지 설치 : 4단 36조 72칸 설치 (× 6개동)

- 3) 중대추 직립식 케이지 설치 : 4단 9조 (× 5개동)
- 4) 육성 직립식 케이지 설치 : 2단 6조 (× 4개동)
- 5) 분판, 급수 설치
- 6) 환기팬, 난방용 전기 난로 (육추실) 설치

다. 실험 계사 작업 내용

- 1) 터파기 공사, 배수구 및 정화조 설치 작업
- 2) 급수 라인 작업 및 바닥 잡석 및 콘크리트 타설 작업
- 3) 철골작업 및 외부, 내부 판넬 공사
- 4) 샤워실 내부 세멘 및 타일 공사
- 5) 천장 배관, 배선 작업 및 전등, 전열 작업
- 6) 덕트 설치 및 바닥 에폭시 도포 작업
- 7) 케이지 내부 설치 작업
- 8) 공조 시스템 설치 작업
- 9) 위생기기 및 온수기 설치 작업
- 10) 에어샤워기 및 패스박스 설치 작업

3. 청정계사 시설 보완 및 소각로, 분뇨 처리 시설 보충

가. 청정계사 시설 보완

2차년도에 건축한 형질전환 특수 개체 관리를 위한 청정계사의 시설 보완을 완료하였다. 시설 보완은 특수 분뇨처리를 위한 자동화 시설 설치를 완료하였다. 따라서 특수 개체 사육을 위한 청정계사 및 보완 시설 확충을 완료하였다. 이는 형질전환 개체의 안정적 유지 및 외부로부터 효율적인 격리를 위한 시설로써 보다 높은 안정성을 확보하였다.

나. 동물 폐사체 처리용 소각로 및 분뇨 처리 시설 설치

형질전환 특수 개체의 안정적인 관리를 위한 동물 폐사 개체 처리 소각로 및 분뇨 처리 시설 설치를 완료하였으며, 이와 같이 청정 계사 시설 보완 및 소각로 시설, 분뇨 처리 시설 보충은 완료하였다.

제 2 절 원시생식기 유래 원시생식세포 체외장기배양기법 확립

1. 배양액에 따른 원시생식세포 배양

본 실험실에서 기존에 확립한 원시생식세포 배양을 위한 배양액인 DMEM이외에 보다 효율적인 원시생식세포 배양 및 닭 생식세포주 확립을 위하여 M199 배양액을 검증하였다. M199은 닭 원시생식세포의 체외 배양을 위한 초기 실험에서 기본 배지로 사용되어져 왔다. M199은 DMEM이나 glasgow MEM 조성보다 glutatione, ribose, thymine, uracil 등 여러 요소들이 더 첨가되어 있어, 본 실험에서 보다 빠른 원시생식세포의 성장을 위하여 검증하였다. 그러나 실험 결과로는 DMEM이나 glasgow MEM과 비교하여 콜로니 형성이나 성장 촉진에는 유의성은 나타나지 않았다. 또한 DMEM 사용에 있어서 high glucose와 low glucose 조성을 검증하였다. 실험 결과 원시생식세포의 장기 배양을 위해서는 low glucose보다 high glucose의 경우가 보다 세포의 상태가 좋게 나타났는데, 이는 장기 배양을 통한 세포 배양에 있어서는 보다 많은 에너지원으로써 glucose가 다량으로 필요하기 때문이라 생각된다. 그리고 특히, 장기배양에 있어서는 배지내에서 쉽게 손실되어지는 glutamine을 별도로 첨가하여 줌으로써 장기배양을 따른 충분한 에너지를 공급하도록 하였다.

이상의 배양 조건으로부터 원시생식세포를 배양하였으며, 배양 일령별 콜로니 형성은 Figure 1과 같다. 사진과 같이 장기 배양후에도 원시생식세포의 형태학상 특징은 그대로 유지되고 있음을 알 수 있다.

2. 발생단계별 원시생식세포의 배양

발생 단계별로 생식선 반월 (germinal crescent), 혈액내, 원시생식기내 원시생식세포를 분리하여 체외 배양을 시도하였다. 우선 각각의 발생 단계별 원시생식세포를 피콜 (Ficoll)을 이용하여 원심분리함으로써 원시생식세포만 순수 분리하여 수를 측정하였다. 생식선 반월 (1일 배양) 80-90, 혈액내 (2.5일 배양) 90-100, 원시생식기 (5.5일 배양) 800-900개 정도의 원시생식세포가 존재하였다. 생식선 반월의 경우에는 원시생식세포 배양시 피콜에 의한 순수 분리 후 배양과 피콜 처리 없이 배양하는 조건을 실험하였다. 그러나 피콜을 처리하였을 경우에는 생식선 반월의 원시생식세포 수가 너무 적어 실질적인 배양이 매우 어려웠으며, 피콜을 처리하지 않았을 경우에는 난황 과립 (yolk granule)이 제거되지 않아 배양이 어려웠다. 따라서 생식선 반월내 원시생식세포 배양을 위해서는 많은 수의 원시생식세포를 순수하게 추출하기 위한 조건 확립 실험이 좀 더 수행되어야 할 것으로 사료된다. 혈액은 피콜로 분리하지 않았을 경우에는 많은 적혈구 수로 인하여 배양이 어렵기 때문에 피콜을 처리하여 배양하였다. 혈액내 원시생식세포 배양 조건은 닭 배자 섬유아세포 (chicken embryonic fibroblast ; CEF), STO cell line (mitomycin-C 처리조건 사용, 아래 조건 참조)과의 공배양 (co-culture)

체계와 기저 세포 (feeder layer) 없이 부유 배양 (suspension culture)을 시도하였다. 닭 배자 섬유아세포와의 공배양은 24-well plate를 기준으로 하여 well당 5×10^3 을 첨가하였으며, well당 20 마리의 배자 혈액내 추출 원시생식세포를 배양하였다. 그리고 mitomycin-C 처리 STO와의 공배양은 mitomycin-C 처리 후 24-well plate를 기준으로 5×10^4 이상의 세포를 공배양 1-2일전에 배양하여 confluence를 100%로 하여 (pre-conditioned culture) 기저세포로 사용하였다. 부유 배양의 경우에는 96-well plate를 기준으로 하였으며, well당 5, 10, 15, 20 마리 배자의 혈액 원시생식세포를 배양하였다. 그러나 생식선 반월과 혈액내 원시생식세포 배양에 따른 세포수의 증가는 관찰되지 않았으며, 3-4일정도 단기간 동안의 세포 유지는 본 실험 조건으로 가능하였다. 생식선 반월 경우에는 위와 같이 너무 많은 난황 과립이 포함되어 있어 세포 성장에 저해를 주는 것으로 생각되며, 실질적으로 형태에 의한 원시생식세포의 구분도 매우 어려웠다. 혈액으로부터의 원시생식세포 배양에 있어서는 생식선 반월에 비하여 비교적 원시생식세포의 분리 및 구분이 가능하였으나, 본 실험실의 배양 조건으로는 안정적인 배양 및 유지는 확립되지 않았다. 따라서, 본 연구실은 발생 단계별 원시생식세포의 배양 조건은 원시생식기내 원시생식세포의 배양을 통하여 최적의 조건을 확립하였다. 원시생식기내 원시생식세포 배양은 24-well plate 기준으로 하여 well당 두 개의 원시생식기 (원시생식세포 수 평균 2×10^3)를 배양하는 조건을 확립하여, 일차 배양 (primary culture)으로 원시생식기내 원시생식기 기저 세포 (gonadal stroma cell)와 같이 배양하였다. 원시생식기내 원시생식세포는 본 실험 조건하에서 안정적인 성장과 콜로니가 형성되었다.

3. 기저 세포에 따른 원시생식세포 배양

생식세포주 확립을 위한 원시생식세포의 기저 세포로는 STO cell line과 닭 배자 섬유아세포 (chicken embryonic fibroblast ; CEF)를 검증하였다. 닭 배자 섬유아세포는 5.5일령 배자 (화이트 레그혼 이용)를 이용하여 트립신 처리 방법에 의해 100mm culture dish당 한 마리 정도로 하여 배양하는 조건을 확립하였다. STO cell line은 기저 세포로 사용할 때 mitomycin-C 처리에 의해 성장을 억제 시켰다. 성장 억제를 위한 mitomycin-C 처리 조건은 $10 \mu\text{g/ml}$ 로 하여 2, 3, 5시간을 검증한 결과, 2시간 처리는 너무 짧아 지속적인 분열을 하였으며 5시간 처리는 너무 길어 세포가 대부분 죽었다. 따라서 mitomycin-C 처리 조건은 $10 \mu\text{g/ml}$ 로 하여 3시간 처리 조건을 확립하였다. 위의 조건으로 우선 혈액내 원시생식세포 및 원시생식기내 원시생식세포의 기저세포와의 공배양을 시도하였다. 24-well plate를 기준으로 하여 성장 억제 처리가 된 STO cell (well당 5×10^4 이상의 cell을 pre-conditioned culture 후 사용)을 well당 피콜에 의해 순수 분리된 두 개의 원시생식기내 원시생식세포와 공배양하였다. 공배양 결과 혈액내 원시생식세포나 원시생식기내 원시생식세포의 수적인 증가나 콜로니 형성은 없었으며 단순히 원시생식세포가 유지되는 정도였다 (Figure 2).

또한 일부의 원시생식기내 원시생식세포는 신경 세포 형태 (neuron-like structure)와 같이 분화하는 양상도 나타냈다 (data not shown). 따라서 본 실험 결과 원시생식기내 원시생식세포와 mitomycin-C 처리 STO cell line과의 공배양 체계는 안정적인 원시생식세포의 분열을 촉진시키지 못하고 원시생식세포의 분화를 유도하였다. 이는 mitomycin-C가 처리된 STO cell과 원시생식세포와의 상호 작용이 되지 않았기 때문이라 생각된다. 이러한 요인으로 첫째, mitomycin-C 처리에 의한 기저세포의 분열 억제는 닭에 있어서의 원시생식세포의 배간 세포화 (stem cell line)에 있어서 충분한 조건을 만족시키지 못하는 것으로 생각되며, 둘째로는 현재 본 연구실에서 사용하고 있는 STO cell line은 membrane-bound SCF receptor (c-kit receptor)가 없는 cell line을 사용하였는데, 이로 인한 배간 세포 유지에 필요한 충분한 신호 전달을 기저세포로부터 받지 못하기 때문이라 생각된다. 닭 배자섬유아세포와의 공배양 체계는 세 가지 방법을 검증하였다. 첫째는 mitomycin-C를 처리하여 성장 억제를 한 배자섬유아세포와 공배양 체계, 둘째는 성장 억제 처리를 하지 않고 지속적인 분열능력을 가진 닭 배자섬유아세포와 피클 처리 후 순수 분리한 원시생식기내 원시생식세포의 공배양 체계, 그리고 원시생식세포를 피클 처리를 하지 않고 원시생식기내 기저 세포 (gonadal stroma cell)와 우선 일차 배양 후 콜로니가 형성되면 성장 억제 처리를 하지 않은 닭 배자섬유아세포와의 공배양을 통한 계대배양 체계를 검증하였다. 실험 결과 mitomycin-C에 의해 성장 억제를 한 닭 배자섬유아세포와의 공배양은 mitomycin-C를 처리한 STO cell line과의 공배양과 같은 결과를 나타내었다. 즉, 원시생식세포의 수 증가는 없었으며 일부 원시생식세포는 신경 세포 형태로 분화하였다. 따라서 결론적으로 mitomycin-C 처리에 의한 성장 억제 기저 세포에서는 원시생식세포의 분열은 없었으며, 오히려 분화 양상을 나타내어 원시생식세포의 분열을 위해서는 분열중인 기저세포가 요구되는 것으로 생각된다. 또한 성장 억제 처리 되지 않은 닭 배자섬유아세포와의 공배양 체계 하에서는 정상적으로 콜로니가 형성되어 원시생식세포의 지속적인 분열을 확인하였다. 공배양시 24-well plate당 닭 배자섬유아세포 수는 2×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 을 검증한 결과, 5×10^3 을 최적 조건으로 확립하였다. 원시생식세포의 지속적인 분열은 일정 계대배양 후, BrdU을 이용한 proliferation assay kit을 사용하여 검증하였다 (Figure 3). 따라서 본 실험을 통하여 원시생식세포의 장기배양 및 계대배양 조건으로 성장 억제 처리가 되지 않은 닭 배자 섬유 아세포와의 공배양을 확립하였다. 이와 같이 원시생식세포의 안정적인 계대배양 조건으로 닭 생식세포주 (chicken embryonic germ cell ; EG cell)를 확립할 수 있는 기본 조건을 마련하였다.

마지막으로 원시생식세포의 기저층으로 extracellular matrix (ECM)을 검증하였다. ECM은 세포와 세포사이의 세포 바깥층에 존재하는 물질로써 세포의 부착또는 이동 등에 관여한다. 따라서 본 실험의 목적은 원시생식세포의 장기 배양에 있어 기저 세포를 사용하지 않고 ECM 코팅에 의한 배양조건을 확립하고자 하였다. 즉, 일차 배양 (primary culture)이나

계대 배양시 별도의 기저 세포의 준비없이 손쉽게 배양을 유지하고자 하였다. 본 실험에서 ECM은 gelatin과 fibronectin type IV를 사용하여 검증하였다. ECM의 culture plate 코팅 조건으로 gelatin은 0.2% 용액을 autoclave 후 실온에서 1시간 이상 처리 또는 4°C에서 1시간 이상 처리하였으며, fibronectin은 0.1mg/ml 용액으로 실온에서 1-2시간 처리하여 사용하였다. ECM으로 코팅된 culture plate에 원시생식기내 원시생식세포를 피펫을 사용하여 순수 분리한 후 24-well plate의 well당 2, 4마리 (4, 8개의 원시생식기내 원시생식세포)의 원시생식기내 원시생식세포를 배양하였다. 그러나 ECM은 원시생식세포에 충분한 안정적인 배양 조건을 만족시키지는 못하였다. ECM상의 원시생식세포의 분열은 관찰되지 않았으며, 다만 일부의 세포가 세포끼리 서로 뭉치는 것이 관찰되었을 뿐 콜로니 형성은 관찰되지 않았다 (data not shown).

4. 성장 인자에 따른 원시생식세포 배양

현재 본 실험실에서 원시생식기내 원시생식세포의 장기 배양을 위한 기본적으로 사용하는 성장인자는 basic fibroblast growth factor (bFGF ; bovine), leukemia inhibitory factor (LIF ; mouse), stem cell factor (SCF ; human), insulin-like growth factor-1 (IGF-1 ; bovine), interleukin-11 (IL-11 ; human)을 사용하여 조건 확립을 하였으며, 이러한 성장인자 없이는 원시생식세포의 안정적인 콜로니 형성이 관찰되지 않았다. 즉, 마우스 배간 세포 배양을 위한 기본 성장 인자인 bFGF, LIF, SCF 이외에 IGF-1과 IL-1을 첨가해 줌으로써 닭의 원시생식세포의 장기 배양 및 배간 세포화를 꾀하고자 하였다. 그러나 보다 효율적인 원시생식세포의 분열을 촉진하기 위한 성장인자로 tumor necrosis factor- α (TNF- α), retionic acid, interleukin-6 (IL-6), ciliary neurotrophic factor (CNTF), GRO- α 등에 대한 실험을 계획하였다. 그러나 당초 계획과 달리, 본 실험 중 “2) 발생단계별 원시생식세포의 배양”중 혈액내 원시생식세포의 부유 배양 조건 확립 후 검증할 계획이었으나 혈액내 원시생식세포의 안정적인 분열 조건 확립 실패와 원시생식세포의 부유 배양 조건 확립 실패로 인하여 실질적으로 보다 효율적인 성장인자의 첨가 조건은 확립하지 못하였다. 이러한 조건의 확립은 현재 일차 배양 및 계대 배양에 있어 7-10일 정도의 배양 기간을 보다 단축시키고자 시도하였다. 그러나 현재 본 실험실에서 확립한 배양 조건으로도 일차 배양 및 계대 배양이 가능하여 기본적인 모든 실험의 수행은 가능한 상황이다.

5. 생식세포주 (EG cell) 계대 배양 및 분화 특성 구명

가. 원시생식세포의 기저세포에 따른 계대 배양 조건 확립

조류, 특히 닭의 배자생식세포주 (embryonic germ cell; EG cell) 배양 조건을 위하여 각각의 기저세포에 따른 계대배양 양상을 조사하였다. 본 연구는 기본적으로 1년차에 확립된

원시생식기내 원시생식세포 배양을 위한 기저 세포와의 공배양 조건을 사용하였다. 이는 배자생식세포주 확립에 있어 일차적으로 지속적인 계대배양 (passage, subculture) 조건 확립이 필수적이기 때문에 이를 위하여 실험이 수행되었다. 마우스에서 배간세포 (stem cell)는 감마선 조사나 마이토마이신 처리에 의해 기저세포 (STO 세포나 배아세포)를 불활성화 시킨 후 그 위에 배양하였다. 그러나 닭의 배자생식세포주는 이러한 조건하에서 일차 배양 (primary culture)이 되지 않았을 뿐만 아니라 지속적인 계대 배양을 위한 기저 세포로써 불활성된 STO 세포주나 배아 섬유아세포는 안정적인 닭 배자 생식세포주의 유지와 분열을 유지시켜 주지 못하였다. 이러한 이유는 닭의 배자생식세포주는 마우스의 배간세포나 배자생식세포주와는 약간의 형태적, 생리적 차이가 존재하기 때문이라 생각된다. 또한, 포유류와 조류간의 진화상의 차이에 의한 체외 배양 조건을 위한 기본배지, 기저세포 및 필요한 성장인자들이 매우 상이할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구실에서는 닭의 배자생식세포주의 확립을 위한 계대배양을 위하여 5.5일령 화이트 레그혼의 배자로부터 트립신-EDTA 처리에 의하여 원시생식기 유래 원시생식세포 (gonadal primordial germ cell; gPGC)를 분리하였으며, 이렇게 분리한 gPGC를 24well plate에 well당 평균 2개의 원시생식기가 포함되도록 하여 초기 배양 (primary culture)에서는 원시생식기 유래 기저세포 (germinal ridge stroma cells)를 이용하여 공배양 조건을 확립하였다. 배지로는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 2% 닭 혈청 (chicken serum), 1mM sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 5.5×10^{-5} M β -mercaptoethanol, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100units/ml 페니실린, 5ng/ml SCF (stem cell factor), 10units/ml LIF (leuketosis inhibitory factor), 10ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor), 0.04ng/ml IL-11 (interleukin-11) 및 10ng/ml IGF-1 (insulin-like growth factor)을 포함하는 배지를 사용하고, 계대배양을 위한 기저 세포로는 분열능력을 가진 닭 배아세포 (chicken embryonic fibroblast; CEF)를 사용하여, 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 결과, 배양을 시작한 지 7 내지 10일 경부터 배자생식세포의 콜로니 (colony)가 형성되는 것이 관찰되었다. 계대배양을 위한 방법으로는 콜로니가 형성된 지 7 내지 10일후 파이펫팅에 의하여 세포들을 기저세포로부터 분리한 후, 원심분리로 세포를 회수하고, 회수된 세포를 적당량의 배양액에 재부유시킨 다음, 닭 배아세포와 함께 새로운 24-well plate에 분주하였다. 이와 같이 원시생식기 유래 원시생식세포로부터 확립된 배자생식세포주 중 일부는 10회 이상의 계대 배양에 성공하여 현재까지 4개월 이상 배양이 가능하였다 (Figure 4). 이에, 본 연구실에서는 국제기탁기관인 재단법인 한국세포주연구재단 (KCLRF)에 기탁번호 KCLRF-BP-00026호로 본 연구실에서 확립된 닭 배자생식세포주를 기탁하였다.

본 연구에서 확립된 닭 배자생식세포주는 콜로니의 거의 대부분이 둥글고 기저세포 (원시생식기내 유래 기저 세포)에 단단하게 밀착되지 않는 특성이 있다. 또한 작은 군락 (colony)으로 촘촘하게 밀집되지 않아서 각각의 콜로니내의 개별 세포의 구분이 쉬웠다. 확립

된 생식세포주의 특징으로는 핵의 크기가 크고, 세포질의 크기는 상대적으로 작았으며, 인(nucleus)은 뚜렷하지 않은 형태를 가지고 있었다 (Figure 4).

6. EG cell의 *in vitro* 검증 (PAS 염색, 항원검색, 분화양상 검증)

가. SSEA-1 항체 검색, 분열 검증 및 PAS 염색

SSEA-1의 발현은 미분화된 마우스의 배간 세포주의 특징 중 하나로서 다능성 세포의 중요한 기준이 되어 왔다. 따라서 본 연구실에서 확립된 닭의 배자생식세포주에서도 계대 배양 후 SSEA-1의 발현을 검증하여, 계대 배양후에도 지속적으로 SSEA-1 epitope의 발현을 확인하였다. 이는 계대배양 후에도 배자생식세포주가 다능성 세포로서의 능력을 가지고 있음을 제시해주고 있다 (Figure 5B). 다능성 세포의 다른 기준으로는 alkaline phosphatase 역가 측정이 있다. 그러나 닭의 원시생식기내의 원시생식세포는 alkaline phosphatase가 세포막에만 분포되어있어 염색을 하여도 매우 약한 반응만을 나타내게 된다 (Swartz, 1982). 따라서 닭의 원시생식세포의 경우에는 alkaline phosphatase 역가 측정보다는 PAS 염색에 의한 세포질내 글라이코젠 (glycogen)의 반응으로 쉽게 확인되었다. 계대 배양된 닭 생식세포주는 매우 약한 alkaline phosphatase 반응을 보였으며, 배양 과정동안 이러한 특성은 회복되지 않았다 (data not shown). 그러나 계대 배양된 닭 생식세포주에 대한 PAS 염색은 원시생식기내의 원시생식세포보다는 다소 약한 반응을 나타내기는 하였지만 어느 정도의 역가는 그대로 유지하고 있었다 (Figure 5A). 이러한 결과는 원시생식세포의 배양을 통한 배자생식세포주 확립시 다능성을 획득하면서 원시생식세포의 고유 특성을 조금씩 잃어 가면서도 어느 정도는 계대 배양을 통하여 완전하게 그 특성이 사라지지는 않은 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 thymidine-bromodeoxyuridine을 이용한 분열 양상 검증하였다. 이는 thymidine-bromodeoxyuridine을 세포 배양중 첨가하면 분열중인 세포의 핵안으로 삽입되게 되고, 이를 특이 항체를 이용하여 검색함으로써 지속적인 분열 여부를 판가름하게 된다. 따라서 이러한 결과는 닭 배자생식세포주가 본 연구에서 확립된 배양 조건하에서는 계대 배양 (passage no. 8)을 통해서도 안정적으로 계속하여 분열하고 있음을 제시하고 있다 (Figure 5C).

나. 체외 분화 검증

체외에서 부유 배양시 단순 또한 복합 배자 형태 (simple or complex embryoid body)의 형성은 다능한 마우스 배간 세포 또는 생식세포주의 특징중 하나이다. 이러한 배자 형태는 근육, 조혈 세포 그리고 신경 세포 등을 포함한 다양한 조직으로 분화하게 되어 배간 세포의 다능성을 보여준다. 계대 배양된 닭 배자 생식세포주를 분화 억제 인자인 mLIF가 없는 배양액을 이용하여 부유 배양하였을 경우 7-10일 경과 후 배자 형태를 형성 유무를 확인

하였다. 실험 결과 닭의 배자생식세포주는 이러한 배양 조건하에서 성공적으로 배자 형체를 형성하였다 (Figure 6A). 따라서, 이러한 결과는 닭 생식세포주가 체외에서의 분화 능력을 보여줌으로써 다능성을 보유하고 있다는 것을 제시한다.

다. immunohistochemistry 방법에 의한 체외 분화 검증

닭 배자 생식세포주가 다양한 조직으로 분화 가능한 것인지를 검증하기 위하여 부유 배양에 의한 형성된 배자 형체를 체외에서 자발적 분화를 유도하였다. 즉, 체외에서 부유 배양에 의하여 형성된 배자 형체를 96-well culture plate에서 부착·성장하게 하여 분화를 유도한 뒤, 조직 특이적인 항체를 이용하여 분화 양상을 검증하였다. 형성된 배자 형체를 수집하여 배양·분화시킨 후, 분화된 배자 형체에 대하여 근육 특이 항체 (actin, Dako, USA), 내배엽 특이 항체 (alpha-1-fetoprotein, Dako, USA), 외배엽 특이 항체 (S100, Dako, USA)를 이용하여 immunohistochemistry 방법으로 분화 양상을 검증하였다. 분석 결과 닭 배자 생식세포주는 체외 분화 유도에 의하여 각각의 조직으로 분화 가능함을 알 수 있었다 (Figure 6B, C, D). 따라서, 이상의 경과로 볼 때 본 연구실에서 확립된 배자 생식세포주는 다능성을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 이에 다양한 목적으로 사용 가능할 것으로 생각된다.

라. EG cell의 *in vivo* 검증 (배자내 주입 및 분화 양상 검증)

닭의 원시생식세포주가 *in vivo*에서도 다능성을 가지고 있음을 제시하기 위하여 초기 배자내 주입을 통한 *in vivo* 분화 양상을 검증하였다. 방법으로는 5.5일령 화이트레그혼의 생식기 유래 배자생식세포주를 한국 재래 오골계의 발달 X단계 (산란직후의 수정란)의 subgerminal cavity에 주입하였다. 화이트레그혼의 깃털색은 흰색으로 우성 (*I/I*)이고, 오골계는 검은색으로 열성 (*i/i*)이므로 흰색의 카이메라가 나올 경우는 화이트레그혼의 배자생식세포주가 오골계의 배자 안에서 정상적으로 분화했음을 증명하는 것이다. 실험결과는 3-4회 계대배양한 배자생식세포주를 45마리의 배자에 주입한 결과 8마리가 발생하였으며, 그중 3마리 (37.5%)가 흰색 깃털을 부분적으로 지녔다 (Table 1). 이들 체세포 카이메라는 목부터 가슴까지 부분적인 흰색 깃털을 지녔으며, 그중 2마리는 3회 계대배양을 거친 배자 생식세포주를 주입한 것이며, 1마리는 4회 계대배양을 거친 배자 생식세포주를 주입한 것이다 (Figure 7). 또한 대조구로 닭의 배아세포 (chicken embryonic fibroblast cell; CEF)를 주입하여 발생한 2마리에서는 흰색깃털을 발견할 수 없었다.

배자생식세포주의 배자내 주입으로 발생한 개체의 생식세포로의 검증을 위하여 본 연구실에서 자체 개발한 화이트레그혼의 특이적인 SCAR (sequence characterized amplified region) DNA marker를 본 연구실에서 개발하여 이용하였다. 이 마커는 화이트레그혼의 계놈상의 특이적인 부분만을 증폭하는 것으로 배자생식세포주의 유래를 판별해 낼 수 있는 것이

다. 실험결과로, 발생도중에 폐사한 병아리 5마리를 대상으로 진행한 결과, 5마리 가운데 1마리는 모든 조직 (간, 심장, 근육, 생식기 등)에서 체세포 카이메라임이 밝혀졌다. 2마리는 생식기에서, 2마리는 심장에서만 체세포 카이메리즘이 판명되었고, 5마리 모두 심장에서는 카이메리즘을 보였다 (Figure 8). 대조구인 닭의 배아세포 (CEF : chicken embryonic fibroblast cell)만을 주입한 경우는 SCAR DNA marker로 어떤 조직에서도 증폭됨을 볼 수 없었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 닭의 배자생식세포주는 체세포뿐만 아니라 생식세포로도 분화가 가능함을 증명하였다.

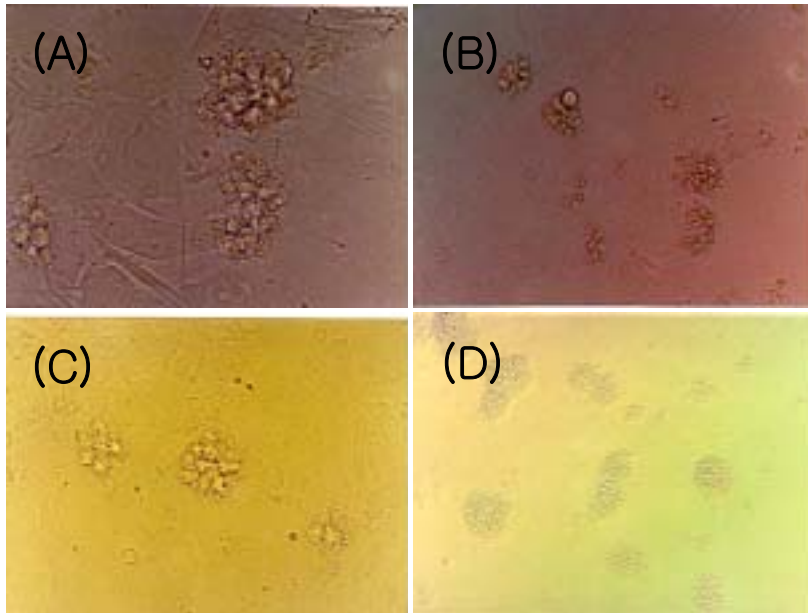


Figure 1. Chicken gPGCs colonies after primary culture on gonadal stroma cells. The colonies are multi-layered and well-delineated. Large size, eccentric nucleus and bright lipid granules are characteristics of gonadal PGCs. (A) 7days (400 ×) (B) 10days (200×) (C) 15days (350×) (D) 30days (100×)

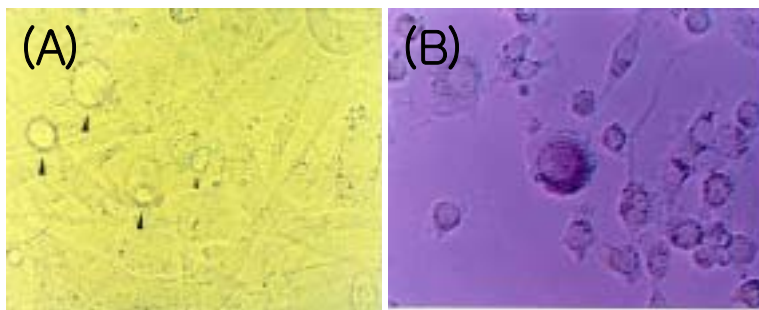


Figure 2. Gonadal (A) and blood (B) PGCs culture on mitomycin-C treated STO cells. Arrows indicate gonadal and blood PGCs. (A) after culture of 7 days (B) PAS staining after culture on STO cells for 9 days. Red cell is PAS-positive blood PGCs.

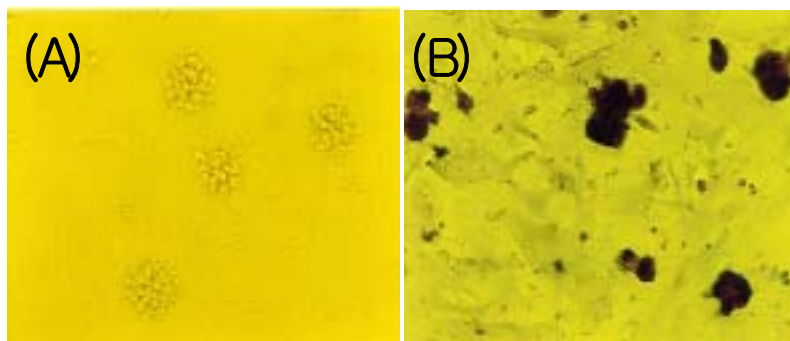


Figure 3. (A) Chicken PGCs colonies after 3 passages on CEF cells. The colonies are uniformly round, multi-layered, and well-delineated. (B) Proliferation assay using BrdU. The mitotically active gPGCs stained with anti-BrdU antibody. The mitotically active PGCs, stained after passages, have black nuclei.

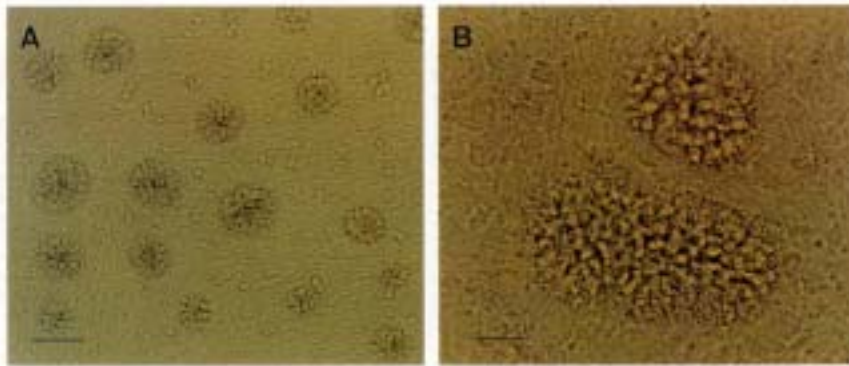


Figure 4. Chicken EG cell colonies after 3 passages on CEF cells. The colonies are uniformly round, multi-layered, and well-delineated. (A) scale, 50 μm , (B) scale, 25 μm

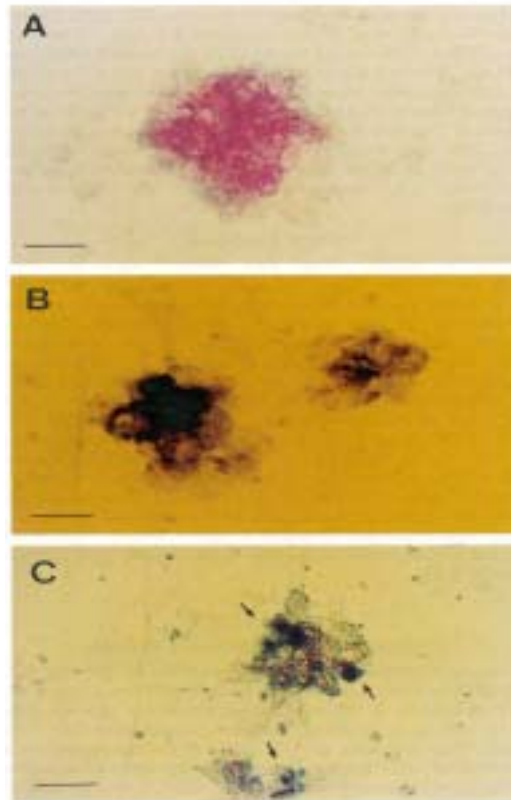


Figure 5. EG cell colonies (A) PAS reactivity in a colony formed after 4 passages (B) SSEA-1 staining. All cells in the colony appear to be positive. Cells were passaged 4 times before staining. (scale bars, 25 μm) (C) Proliferation assay using BrdU. The mitotically active EG cells were stained after 8 passages. Arrows indicate EG cells in proliferation (scale bars, 33 μm)

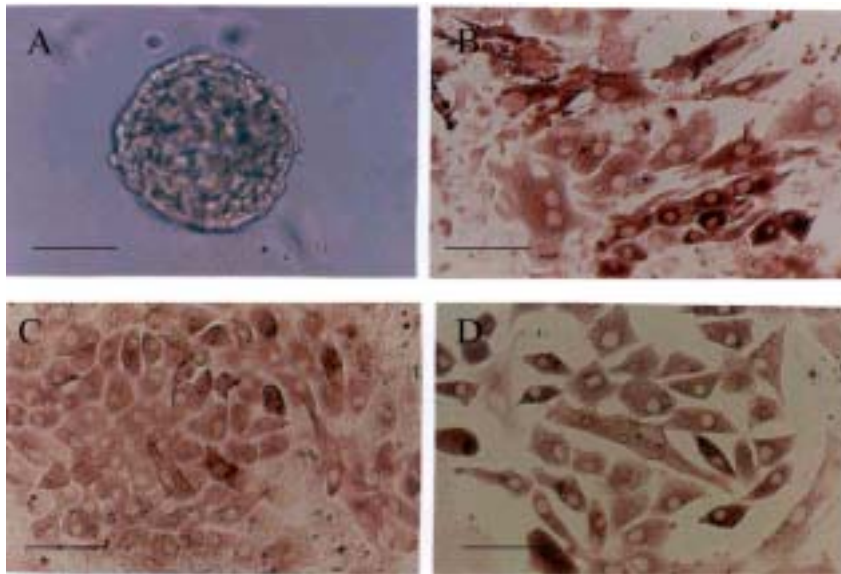


Figure 6. (A) Embryoid bodies formed in suspension after 8 days in culture . The EG cells were previously passaged 4 times. Immunohistochemical analysis of embryoid bodies with three germ layer-specific antibodies after attachment and differentiation. (B) Muscle cells stained strongly with anti-actin antibodies. (C) Colonies stained strongly with anti-alpha-1-fetoprotein antibody. (D) Colonies stained strongly with anti-S100 antibody (scale bars, 50 μm).

제 3 절 생식세포주 (EG cells)에 의한 생식선 카이메라 생산

1. EG cell의 *in vivo* 주입 기법 확립

가. EG cell의 혈관내 주입

생식세포주의 혈관내 주입은 본 실험실에서 기존에 확립한 방법인 2.5일령 배자의 혈관에 미세주입하는 방법을 이용하였다. 그러나 생식세포주의 경우에는 일반적인 원시생식세포와 달리 개개의 세포가 하나씩 존재하지 않고 콜로니를 형성하고 있기 때문에 기존의 방법을 그대로 사용하였을 경우에는 미세바늘이 막힐 뿐만 아니라 수용체 혈관 또는 심장내 혈액의 흐름을 방해하여 수용체 배자의 혈관이나 심장이 터지게 된다. 따라서 콜로니의 생식세포주를 개개의 세포를 분리하기 위하여 단순한 파이프팅에 의한 방법과 트립신 처리에 의한 방법을 검증하였다. 그러나 트립신에 의한 방법은 직접적인 효소 처리에 의한 생식세포주에 영향을 줄뿐만 아니라 여러 과정을 반복해서 거쳐야 하는 단점으로 인하여 트립신 처리 방법보다는 여러 번의 파이프팅에 의한 개개의 세포로 분리하는 방법을 이용하였다. 이는 닭 생식세포주의 콜로니는 세포간의 강한 결합으로 연결되어 있지 않기 때문에 손쉽게 개개의 세포로 분리하는 것이 가능하였다.

나. EG cell의 blastodermal cell내 주입

생식세포주의 배반엽 세포층 (blastodermal layer)안에 주입하기 위해서는 먼저 수용체 배자 (stage X, 부화를 시작하지 않은 신선한 수정란)를 옆으로 누어 최소 12시간 이상 정치하여 사용하였다. 이는 옆으로 하였을 경우에 배자를 가장 근접하게 조작하는 것이 가능하기 때문이다. 침단부의 경우에는 미세바늘로 조작하기 위해서는 배자까지의 거리가 너무 멀어 조작이 힘들었으며, 둔단부의 경우에는 기공 (氣空 : air sac)이 존재하기 때문에 조작이 어려울 뿐만 아니라 발생에 큰 영향을 미치기 때문에 최종적으로 정치 후 옆부분에 작은 구멍을 내어 배자에 조작을 하였다. 조작 후 구멍은 parafilm으로 2회 밀봉하는 조건을 이용하였다. 2회 실험 결과는 Figure 9와 같다. 이상의 결과를 볼 때, 배반엽 세포층에 주입한 경우 (14.4%)가 혈관내 미세주입한 경우 (61.3%)보다 급격하게 발생율이 떨어지는 것을 알 수 있다. 이는 혈관 주입보다는 배반엽 세포층 주입이 초기 배자에 손상을 많이 주기 때문이라 생각된다. 특히, 배반엽 세포층 미세주입의 경우에는 발생전까지는 60.4%의 높은 생존율을 나타내고 있으나 발생 과정중에 파격을 하지 못하여 죽거나 발생 후에도 약추로 인한 조기 폐사율이 매우 높게 나타났다. 따라서 배반엽 세포층에 대한 손상은 발생과정중에도 영향을 미치지만 특히 발생 마지막 단계에서 영향을 크게 미치는 것을 알 수 있다. 위의 실험에서 혈관내 미세주입의 경우에는 평균 61.3%의 발생율을 나타내어 본 실험실에서 확립된 혈관내

미세주입 기법은 세계 어느 연구 기관보다 높은 성공률을 보이고 있다. 따라서 배자 혈관내 미세주입 기법은 본 연구실에서 완전하게 확립되었음을 알 수 있다.

2. EG cells 주입에 의한 생식선 이동 능력 검증

EG cells 주입에 의한 EG cells의 이동 능력 검증 및 생식선 카이메라 생산 여부를 위하여 먼저 *in vitro* test를 수행하였다. 본 실험은 각각의 계대 배양에 따른 EG cells을 배양하였으며, 이를 PKH26 형광 염료로 labelling한 후 수용체 배자내 주입하여 형광을 관찰함으로써 수용체 배자의 원시생식기내로의 이동 능력을 검증하였다. 수용체 배자는 기존에 본 연구실에서 확립된 방법으로 stage 13-14 (53시간 배양)에 EG cells을 주입하였으며, 이를 5.5일령까지 추가적인 배양을 한 후, 배자로부터 원시생식기를 추출하여 다른 조작 없이 전체 원시생식기를 형광현미경으로 관찰함으로써 EG cells의 이동 능력 및 수용체 배자의 원시생식기로의 전이 여부를 파악하였다. 실험결과, P₀ EG cells의 경우 12마리 처리구중에 4마리에서 형광이 관찰되어 33.3%의 이동능 (migration activity)을 나타냈으며, P₁ EG cells의 경우에는 26마리의 처리구중 18마리에서 형광이 관찰되어 69.2%의 이동능을 나타내어 평균 57.9%였다 (Figure 10). 이는 2일 배양 후 주입한 경우 (88.9%)에 비하여 30% 가량 이동능이 감소한 결과로 이는 단기간 배양에 비하여 장기 배양시 어느 정도의 원시생식세포 이동 능력의 변화가 있었음을 알 수 있었다. 그러나 이는 초기의 원시생식세포가 장기 배양 과정을 통하여 원래의 원시생식세포의 능력을 일부 보존하기는 하지만 원시생식세포에서 다능성의 배간 세포인 생식 세포주 (EG cells)로 전환되며 나타날 수 있는 현상으로 사료된다. 따라서 *in vitro* test 결과로 볼 때, 본 연구실에서 확립된 EG cells의 수용체 배자 내로의 재주입시 원시생식기내로의 안정적인 전이가 가능할 것으로 생각된다. 또한 본 실험을 통한 결과 중 하나는, EG cells 주입시 특이적으로 한쪽 원시생식기내로의 전이가 나타났으며, 형광이 관찰된 원시생식기내의 분포도를 볼 때에도 특징적으로 원시생식기의 표층 (epithelium)에 집중적으로 분포하고 있음을 알 수 있었다. P₀ EG cells의 경우, 형광이 관찰된 4마리 모두가 한쪽 원시생식기내로만 전이됐으며, P₁ EG cells의 경우에는 형광이 관찰된 18마리 중 13마리에서 관찰되어 72.2%의 비율을 나타내었다. 하지만 현재까지 정확한 기작 및 EG cells의 수용체 배자내의 분포도 미치는 요인은 알 수 없었다.

3. EG cell 주입에 의한 생식선 카이메라 생산

생식 세포주의 수용체 배자 주입시 원시생식기로의 이동, 분열·분화 확인 및 정상적인 성성숙 여부를 검증하기 위하여 수용체 배자에 EG cells을 주입하고 발생시켜 성성숙 도달 후 후대 검정을 시도하였다. 이는 주입한 EG cells이 수용체 배자의 생식기에서 정상적인 성분화 과정을 거쳐 다음 세대로의 전달이 가능한지를 판별하고자 하였다. 즉, 다능성 생식

세포주 검증을 위한 가장 중요한 기준인 다음 세대로의 전이 가능성을 확인하였다. 후대검정은 총 191수에 대하여 20주 이상 실시하였으며, 각각의 실험축은 원시생식기 유래 원시생식세포 (gPGCs, 2일 배양 및 10일 배양 P₀ cells) 주입 개체 전체 176수, P₁ EG cells 주입 개체 11수, P₂ EG cells 주입 개체 4수이며, 전체 191수에 대한 자손을 생산하여 검증하였다 (Table 2). 현재까지 후대검정 결과에서 gPGCs를 이용한 경우 전체 176수 중 15수 생식선 카이메라 (2일 배양; 7수, 6.2%, 10일 배양 P₀; 8수, 12.7%)를 생산하였으며, 계대 배양된 EG cell을 이용한 경우에는 15수 중 2수 (P₁ EG cells; 1수, 9.1%, P₂ EG cells; 1수, 25.0%)를 생산하였다 (Figure 11). 생식선 카이메라 생산 효율은 원시생식세포 주입과 계대 배양된 생식세포주 주입의 경우 유의적 차이는 없었다 (8.5% vs. 13.3%). 그러나 생식세포주를 이용한 경우 실험축이 충분하지 않아 통계적인 유의성 분석은 어려움이 있었다. 생식선 전이 효율 (germline transmission efficiency)에 있어서는 P₀ cells 주입에 의한 효율 (27.6%)이 다른 처리구에 비하여 높았다 (Table 3). 계대 배양된 생식세포주의 경우에는 10일 단기 배양 원시생식세포보다는 비록 효율이 낮았으나, 2일 배양된 원시생식세포 주입에 의한 효율과는 큰 차이가 없었다 (1.3% vs. 1.5 to 14.6%). 이러한 결과는 앞서 PKH26 형광 염료를 이용한 초기 배자에서의 이동능 검증 실험과 다른 양상을 보여 주고 있다. 즉, P₀ cells 주입시 이동능 33.3%, P₁ EG cells 주입시 69.3%의 효율을 보여 2일 배양한 원시생식세포 주입시 보다 (88.9%) 20-50% 가량 낮았으나 최종적으로 검정교배에 의한 생식선 전이 효율은 반대의 결과가 도출되었다. 이는 원시생식세포의 이동능과 동시에 다음 세대로의 전이를 위해서는 원시생식기내로의 이동 후 성세포로의 분화, 분열이 매우 중요함을 제시해주고 있다. 현재까지 생식 세포주를 이용한 생식선 카이메라 생산 효율 및 생식선 전이 효율은 비록 낮고 생선선 카이메라 수수도 적지만, 현재까지 다능성 배간 세포 (stem cell)를 이용한 생식선 카이메라 생산 보고가 실험 동물인 마우스이외는 전무한 상황에서 다른 축종, 특히 일반 가축에서의 보고는 세계 최초로서 학문적 의미와 파급 효과가 매우 클 뿐만 아니라 산업적 이용성도 매우 클 것으로 예상된다. 그러나 낮은 생식선 카이메라 효율을 높이기 위한 연구가 더욱 필요할 것으로 판단된다. 즉, 체외 배양 조건 향상, 새로운 미세 주입 방법 개발 및 실험축은 수용체 배자내 미세 주입을 위한 EG cells의 암·수 성판별을 하지 않은 상황에서 수행되었으므로 암·수 생식세포의 혼합에 의한 효과 제거 등에 대한 앞으로 연구가 좀더 수행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 장기 배양을 통해 확립된 EG cells이 수용체 배자에서의 이동능 (migration activity)을 보유하고 있지만, 전이 후 분열·분화 및 성세포로의 발달에 미치는 요인이 있을 것으로 사료된다. 즉, 위에서의 결과에서 제시했듯이 EG cells의 수용체 배자의 원시생식기로의 전이 후 대부분이 표층 (epithelium)에 분포하는 현상이 나타난다. 이는 정상적인 원시생식세포는 원시생식기 도달 후 대부분이 원시생식기 내층 (medullary tissue)으로의 이동과정을 거치게 되는데 이러한 과정중에 일부 영향이 있을 것으로도 예상된다. 그러나

아직까지 정확한 요인은 밝혀지지 않았으며 현재 진행 중에 있다. 또 하나의 가능성은 성공적으로 EG cells이 원시생식기내로 전이되었다하더라도 이후 분화과정이 정상적으로 진행되지 않았을 가능성도 존재한다.

Table 1. The production of somatic chimeras by transplantation of chicken embryonic germ (EG) cells into blastodermal layer at stage X.

No. of injected embryos	No. (%) of hatched chicks	No. (%) ^a of somatic chimeras produced
45	8 (17.8%)	3 (37.5%)

^a The somatic chimeras were judged by phenotypical characteristics (Ogol chick retained white patches or not)

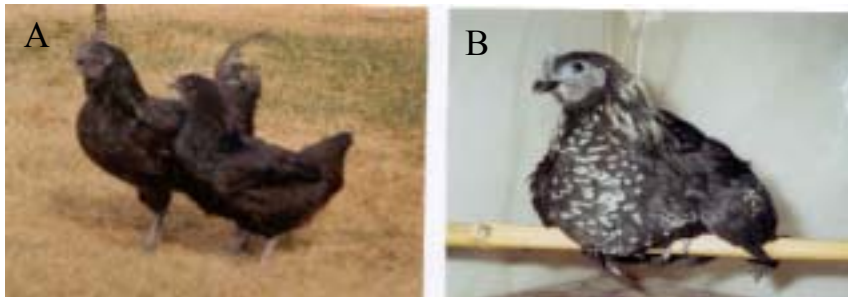


Figure 7. (A) The typical Korean Ogol chickens, which not injected with EG cells derived from a White Leghorn, are all black. (B) One somatic chimera retained the white patches after 3 months. The chimera has white patches around the neck and on the breast.



Figure 8. PCR analysis using White Leghorn-specific SCAR primers. Four tissues (liver, muscle, heart, and gonads) were dissected from 5 chicks which died during hatching. M : λ DNA digested with *Hind* III, Lanes 1, 5, 9, 13 and 17 : liver, Lanes 2, 6, 10, 14 and 18 : muscle, Lanes 3, 7, 11, 15 and 19 : heart, Lanes 4, 8, 12, 16 and 20 : gonads, Lane 21 : Korean Ojol chicken genomic DNA, Lane 22 : White Leghorn genomic DNA, Lane 23 : no template.

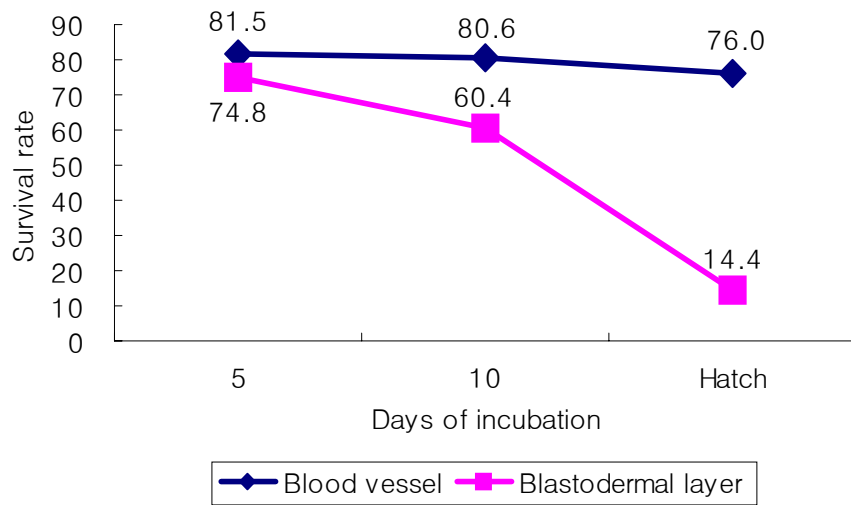


Figure 9. Survival and hatchability rates of embryos which injected into blastodermal layer or blood vessel.

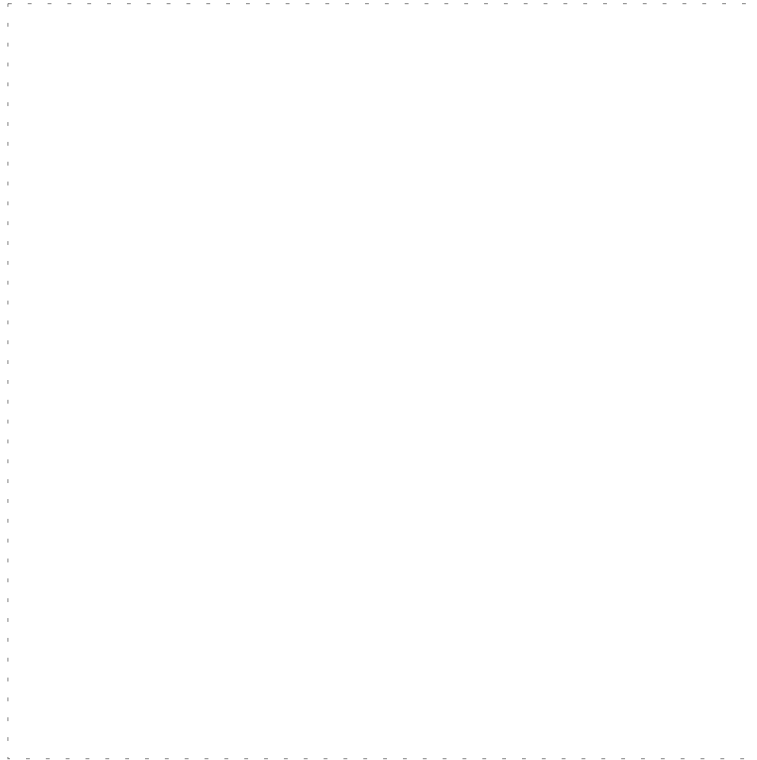


Figure 10. Detection of PKH26-labelled gPGCs and EG cells. (A) & (B) Injection of non-cultured gPGCs (freshly isolated gPGCs) (C) & (D) Injection of passaged (P_1) EG cells. (E) & (F) Injection of passaged (P_2) EG cells. (A), (C) & (E) ; under the bright phase. (B), (D) & (E) : under the fluorescence.

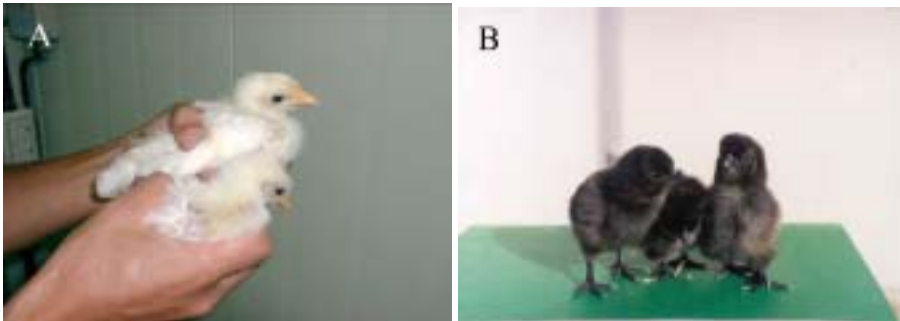


Figure 11. Progenies of germline chimeric chicken, into which injected passaged (P_2) White Leghorn EG cells. White color indicates progenies stemmed from White Leghorn EG cell. (A) Progenies from chimera. (B) typical Ogol chicks.

제 4 절 초기 배자의 성판별 기법 확립

1. 원시생식세포의 초기 성판별 기법 확립

가. W 염색체 특이적 PCR 프라이머 확보

원시생식세포의 조작에 있어 암·수 구별은 중요한 의미를 갖는다. 즉, 서로 반대 성(性)의 원시생식세포가 원시생식기내로 들어갔을 경우 (수컷의 원시생식세포가 암컷의 원시생식기내로, 혹은 반대로) 생리학적, 발생학적으로 영향을 미칠 것을 생각된다. 따라서, 본 실험에서는 암탉의 W 염색체상의 특이 부분을 PCR 기법으로 증폭하여 성감별을 하고자 시도하였다. 닭의 W 염색체상에는 717bp 크기로 약 14,000회정도 반복적으로 나타나는 *Xho* I 반복 염기 서열 (repetitive sequence)와 1,100bp 크기로 약 6,000회 정도 반복적으로 나타나는 *Eco* RI 반복 염기 서열 (repetitive sequence)가 존재하게 된다. 따라서 이러한 반복 서열을 목적으로 하여 프라이머 제작과 PCR 수행은 초기 배자에서의 암·수 구별이 가능하게 된다. 본 실험에서는 *Xho* I repetitive sequence를 목적으로 하였다. PCR을 위한 프라이머는 717bp의 염기서열중 416bp와 348bp 크기가 되도록 제작하였으며, 염기서열은 Table 4와 같다. 또한 Ogawa 등이 보고한 조류 W 염색체 특이 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 396bp 크기의 PCR 프라이머를 제작하였다. 따라서, 본 실험에서는 총 3종류의 프라이머를 제작하여 닭의 성판별에 이용하였다. PCR 조건으로는 변성 (denaturation) 94°C 60초, 프라이머 부착 (annealing) 60°C, 60초 그리고 증폭 (extension) 72°C, 40초로 하여 35회 반복 실행하는 것을 확립하였다. genomic DNA를 사용하여 PCR 수행 결과 3종의 프라이머 모두가 제작시 예상했던 크기의 PCR 산물이 암컷의 DNA에서만 특이적으로 증폭되어 제작한 프라이머가 정상적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다 (Figure 12). 그러나 nCES#1/#2 프라이머의 경우에는 예상한 348bp보다 적은 크기의 PCR 산물이 암컷 특이적으로 증폭되었다. 이는 암컷 특이적으로 증폭되는 것으로 미루어 W 염색체상의 다른 부위가 본 실험에서 제작한 프라이머에 의해 같이 증폭되거나, 혹은 W 염색체의 다른 반복 서열의 증폭 산물로 추정된다 (Figure 12). 본 실험에서 사용된 축군은 화이트 레그혼과 오골계를 사용하였으며, 두 품종 모두에서 PCR에 의하여 암·수 성감별이 가능하였다. 또한 프라이머의 암·수 특이성 및 PCR 감별 감도 (sensitivity)를 측정하기 위하여 genomic DNA를 이용한 희석 실험 (dilution test)을 수행하였다. 수행 결과, CES#1/#2 프라이머는 암컷 DNA에서 1ng까지 증폭이 가능하였으며, nCES#1/#2 프라이머의 경우에는 3ng까지 PCR 증폭이 가능하였다 (Figure 13). 수컷의 DNA 수행 결과는, 두 프라이머 모두 300ng의 DNA 양에서도 PCR 산물이 증폭되지 않아 제작한 프라이머 모두 암컷에 대해 매우 높은 감도의 PCR 특이성을 가지고 있음을 알 수 있다 (Figure 14).

나. whole-blood direct PCR 조건 확립

위 실험에서 확립된 프라이머를 이용하여 혈액에서의 직접적인 PCR 가능성을 검증하였다. 이는 배자 조작시 매우 적은 양의 혈액만을 추출하기 때문에 기존 방법에 따른 genomic DNA 추출이 사실상 불가능하기 때문에 혈액을 이용한 직접적인 PCR 조건을 확립해야 한다. 따라서 예비 실험으로 성계의 혈액을 추출하여 whole-blood direct PCR 조건을 확립하였다. 혈액 1~2 μ l를 추출하여 1ml ddH₂O에 희석하였으며, PCR을 수행하기 전에 세포막을 파괴하여 genomic DNA를 유출시키기 위하여 희석한 10 μ l 혈액 샘플을 PCR 튜브에 20 μ l ddH₂O와 혼합한 후, 40 μ l mineral oil를 첨가하여 97 $^{\circ}$ C, 5분과 55 $^{\circ}$ C, 5분을 5회 반복하였다. 5회 반복 후 20 μ l PCR 반응액 (2.5mM dNTP mixture, 100mM Tris-Cl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 20pmol forward primer, 20pmol reverse primer, 2 units Taq polymerase)을 PCR 튜브 혈액 샘플내로 mineral oil층을 조심스럽게 통과하여 첨가하였다. PCR 반응액을 첨가한 샘플은 위 실험에서 확립된 조건으로 하여 변성 (denaturation) 94 $^{\circ}$ C 60초, 프라이머 부착 (annealing) 60 $^{\circ}$ C, 60초 그리고 증폭 (extension) 72 $^{\circ}$ C, 40초로 하여 35회 반복 실행하였다. 3종의 프라이머에 대한 실험 수행 결과, nCES#1/#2와 QSEX#1/#2 프라이머는 genomic DNA 실험과 같은 결과로 348bp와 396bp 크기의 PCR 산물이 증폭되었으나 CES#1/#2 프라이머 경우에는 whole-blood direct PCR에 의해 증폭되지 않았다. 이는 CES#1/#2 프라이머가 nCES#1/#2이나 QSEX#1/#2 프라이머보다 PCR에 대한 안정성이 낮기 때문이라 사료된다. 이와 같이 whole-blood direct PCR은 nCES#1/#2와 QSEX#1/#2 프라이머를 이용하여 매우 적은 양의 혈액으로도 성관별을 할 수 있는 조건을 확립하였다.

2. 초기 배자 혈액의 PCR 기법 의한 성관별 기법 확립

위에서 확립된 whole-blood direct PCR을 이용하여 초기 배자에서의 성관별을 수행하였다. 본 실험은 5일령 배자의 혈관으로부터 1~2 μ l의 혈액을 microcapillary pipette (Sigma, Cat. No. P-2174)을 이용하여 추출한 후 1.5ml 튜브에 100 μ l ddH₂O와 함께 혼합하였다. 혼합액중 10 μ l를 20 μ l ddH₂O와 다시 혼합하여 0.5ml PCR 튜브에 넣은 후 40 μ l mineral oil를 첨가하였다. 세포막 파괴와 genomic DNA 유출을 위하여 97 $^{\circ}$ C, 5분과 55 $^{\circ}$ C, 5분을 5회 반복한 후, 20 μ l PCR 반응액 (2.5mM dNTP mixture, 100mM Tris-Cl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 20pmol forward primer, 20pmol reverse primer, 2 units Taq polymerase)을 PCR 튜브 혈액 샘플내로 mineral oil층을 조심스럽게 통과하여 첨가하였다. PCR 반응액을 첨가한 샘플은 변성 (denaturation) 94 $^{\circ}$ C 60초, 프라이머 부착 (annealing) 60 $^{\circ}$ C, 60초 그리고 증폭 (extension) 72 $^{\circ}$ C, 40초로 하여 35회 반복 실행하였다. 실험 결과 nCES#1/#2와 QSEX#1/#2 프라이머는 정상적으로 348bp와 396bp 크기의 PCR 산물이 증폭되어 초기 일령의 배자의 적은 양으로도 정확하게 성관별을 할 수 있는 조건을 확립하였다 (Figure 15).

Table 2. Birth of germline chimeras by transplantation of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) cultured in vitro for different durations or chicken embryonic germ (EG) cells prepared from subculture.

Transferred cell types	No. of progenies undertaken testcross analysis ^a	No. (%) ^b of germline chimeras produced
gPGCs		
Cultured for 2 days	113	7 (6.2)
Colonized (P ₀)	63	8 (12.7)
Passaged EG cells		
First passed (P ₁)	11	1 (9.1)
Second passed (P ₂)	4	1 (25.0)

^aOnly sexually-matured progenies provided for testcross analysis.

^bPercentage of the number of germline chimeric chickens undertaken testcross analysis.

Table 3. Transmission efficacy in germline chimeras produced by transplantation of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) cultured in vitro for 2 days or 10 days (colonized) and chicken embryonic germ (EG) cells prepared from subculture.

Origin of germline chimeras	No. of chickens proved as a germline chimera	No. of chickens hatched	No. (%) ^a of donor-derived white hybrid chicks produced
gPGCs			
Cultured for 2 days	7	2,332	31 (1.3)
Colonized (P ₀)	8	944	261 (27.6)
Passaged EG cells			
First passed (P ₁)	1	131	2 (1.5)
Second passed (P ₂)	1	157	23 (14.6)

^aPercentage of the number of hatched chickens, which indicate the donor-derived progenies.

Table 4. Primer sequences for embryo sexing. Amplification regions of CES#1/#2 and nCES#1/#2 primer are Xho I-repetitive sequences on W-chromosome and amplification region of QSEX#1/#2 primer is putative functional gene which is located on W-chromosome but the exact function is unknown.

Primer	Sequence	Reference
CES #1	5'-CCC AAA TAT AAC ACG CTT CAC T-3'	Petitte et al.
CES #2	5'-GAA ATG AAT TAT TTT CTG GCG AC-3'	
nCES #1	5'-ACC TGT CTC CCA AAA ATT CTG C-3'	This study
nCES #2	5'-TGG GGTGAA ATG GGG TTG-3'	
QSEX #1	5'-CTA TGC CTA CCA CAT TCC TAT TTG C-3'	Ogawa et al.
QSEX #2	5'-AGC TGG ACT TCA GAC CAT CTT CT-3'	

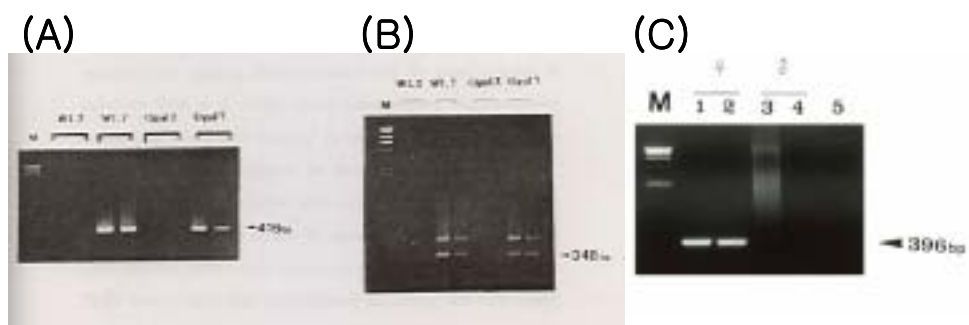


Figure 12. PCR amplification of Xho I repetitive sequence on W-chromosome. PCR product was produced on in female but not in male. (A) PCR product of CES#1/CES#2 primers. The size of PCR product was 416bp. (B) PCR product of nCES#1/nCES#2. The size of PCR product was 348bp. (C) PCR product of QSEX#1/QSEX#2. The size of PCR product was 396bp. (M ; size marker, λ DNA digested with Hind III, WL ; White Leghorn)

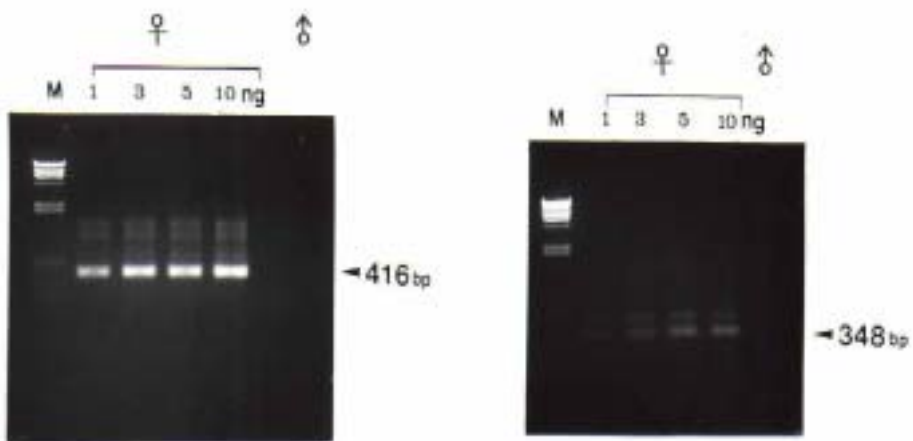


Figure 13. Dilution test of female genomic DNA. PCR product of CES#1/CES#2 primers and nCES#1/nCES#2 primer was 416bp and 348bp respectively. PCR product was detected even in 1 ng of female genomic DNA but not in male genomic DNA. (M ; size marker, λ DNA digested with Hind III)

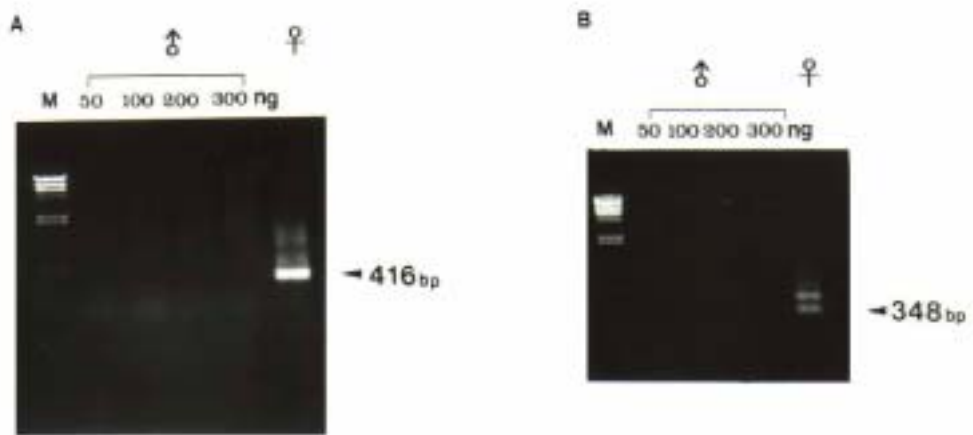


Figure 14. Dilution test of male genomic DNA (CES#1/CES#2 primers and nCES#1/nCES#2 primer). PCR product was not detected even in 300 ng of male genomic DNA. (M ; size marker, λ DNA digested with Hind III)

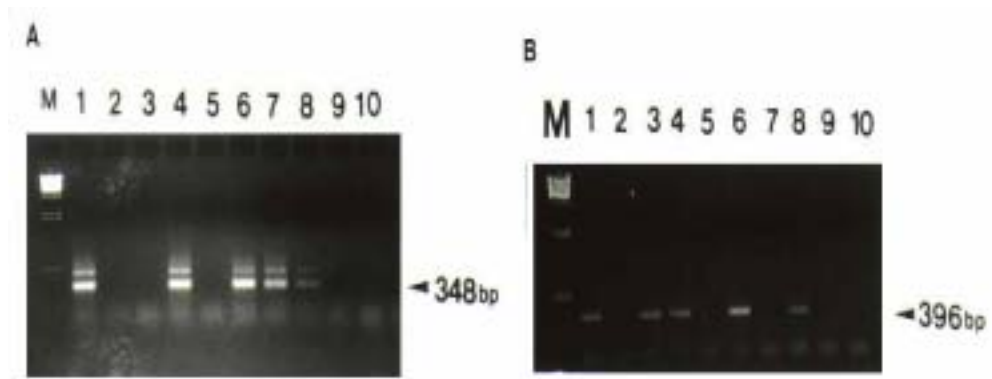


Figure 15. Whole-blood direct PCR with blood of donor embryo at stage 28 (5.5 days of incubation). (A) PCR product of nCES#1/nCES#2 primers. The embryo in lane 1, 4, 6, 7, 8 was female and the embryo in lane 2, 3, 5, 9, 10 was male. (B) PCR product of QSEX#1/QSEX#2 primers. The embryo in lane 1, 3, 4, 6, 8 was female and the embryo in lane 2, 5, 7, 9, 10 was male. (M ; size marker, λ DNA digested with Hind III).

제 5 절 성장촉진을 위한 효율적인 벡터개발 및 발현양상 검증

1. 닭 성장 관련 유전자 및 유전자 발현 프로모터 확보

닭 성장 관련 유전자로서 닭 성장 호르몬 유전자 (chicken growth hormone ; cGH), 사람 성장 호르몬 (human growth hormone ; hGH) 및 myostatin 등 성장 관련 유전자들은 확보하였다. 이러한 성장 관련 유전자 발현을 위한 프로모터는 현재까지 높은 발현을 위한 CMV 프로모터, 일정양의 발현을 위한 TK 프로모터, 근육조직 특이 발현을 위한 chicken β -actin 프로모터, 유도 발현 (inducible expression)을 위한 metallothionein (MT) 프로모터와 테트라사이클린 유도 프로모터 (tetracyclin inducible promoter) 등 다양한 발현 조절 유전자를 확보하였다. MT 프로모터의 경우에는 아연 (Zn), 구리 (Cu) 등에 발현 유도성을 나타내며, 마우스나 돼지에 있어서 많은 연구가 수행되었으나 닭을 포함한 가금에 경우에는 연구가 전무한 상황에 있다. 따라서 본 연구실에서는 닭에 있어서의 적용을 위하여 아연 (Zinc sulfate)을 사용하였으며, 가장 최적의 농도는 1,000ppm을 음수 투여하는 조건을 확립하였다. 즉, 아연 등은 과량 투여하였을 경우 실험축에 영향을 줄 수 있으므로 최소 용량의 최대 효과를 위한 기본 조건 확립이 필수적이다. 또한, 보다 어린 일령에서의 안정성 검증을 위해서 병아리에 직접 주입을 하였다. 투여 조건은 2주령 병아리에 1,000ppm Zn 농도로 하여 일주일에 1-2회 음수 투여하였다. 실험 결과, 기존의 보고된 MT 프로모터 유도를 위한 Zn 적정 농도인 1,000ppm 농도의 음수 투여를 하여도 개체에는 크게 영향을 하지 않음을 알 수 있다. 그러나 최종적으로 체내에서의 MT 발현 조절 유전자의 아연 대한 최적 조건 및 유도성은 형질전환 개체 생산 후 검증해야 할 것으로 사료된다.

2. 유용 벡터 재조합

위에서 확보된 성장 관련 유용 유전자와 발현을 위한 조절 프로모터를 이용하여 유용 벡터를 재조합하였다. 현재까지 재조합된 벡터로는 CMV 프로모터와 hGH를 결합시킨 벡터 (대량 발현), TK 프로모터 (일정 수준의 발현량)와 hGH를 결합시킨 벡터가 있으며, 유도 발현 벡터로 아연 (Zn)에 특이적으로 유도 발현하는 MT 프로모터와 hGH 결합 벡터 및 테트라사이클린 유도 발현 재조합 벡터는 현재 벡터내 염기 서열 분석 (DNA sequencing)과 체외 세포 배양 (*in vitro* cell culture)을 통하여 유도성을 검증하였다. 제작된 벡터는 염기 서열 분석을 통하여 조절 부위 및 재조합한 유용 유전자의 정확성을 확인하였으며, 유도성 검증은 NIH3T3 cell line과 닭 배자섬유아세포 (chicken embryonic fibroblast ; CEF)를 이용하여 유전자 전이 후 테트라사이클린을 처리하여 유도된 발현 정도를 검증하였다.

3. 세포주 (Hela cell line, STO cell line)에서 *in vitro* 발현 검증

세포주내 발현 검증을 위하여 우선 표지 유전자를 이용한 Hela cell line 및 STO cell line으로의 외래 유전자 전이 및 발현 양상을 검증하였다. 우선 각각의 세포주에는 리포솜을 이용하여 CMV 프로모터에 GFP 형광 유전자가 결합된 유전자를 도입한 후 유전자 전이 및 발현 양상을 검증하였다. 이러한 방법을 이용하였을 경우, 각각의 세포주에 30-40%의 유전자 전이 효율을 나타냈으며, 유전자가 전이된 세포의 경우에는 강한 발현 양상을 나타내었다 (data not shown). 닭의 경우에는 배아세포 (chicken embryonic fibroblast; CEF)로의 리포솜을 이용한 유전자 전이 효율은 30%였으며, CMV 프로모터를 이용하여 닭의 세포에서도 외래 유전자의 안정적인 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 안정적으로 발현되는 세포만을 선발하기 위하여 세포주 또는 닭 배아세포로의 유전자 전이 후 네오마이신 (neomycin; G418)을 이용한 선발 (selection) 조건을 확립 실험을 수행하였다. 네오마이신에 따른 닭 섬유아세포의 생존율은 50 μ g/ml, 150 μ g/ml, 250 μ g/ml, 350 μ g/ml, 500 μ g/ml 농도로 하여 측정하였다. 실험 결과 50 μ g/ml와 150 μ g/ml에서는 닭 섬유아세포의 생존율에 영향없이 지속적인 분열을 하였으며, 250 μ g/ml 농도에서는 15일 이후에서 생존율이 감소하였다. 또한 350 μ g/ml와 500 μ g/ml 농도에서는 10일이내 모든 세포들이 죽는 것으로 나타냈다 (data not shown). 그러나 500 μ g/ml의 농도에서는 5일이내에 거의 모든 세포들이 죽는 것으로 나타나 세포에 너무 많은 해를 끼치는 것으로 분석되었다. 따라서 본 연구실에서는 닭의 섬유아세포를 포함한 닭 세포에서의 선발을 위한 네오마이신 적정 농도는 350 μ g/ml로 결정하였다. Figure 17는 닭 섬유아세포에 표지 유전자를 전이시킨 후 적정 네오마이신을 이용하여 안정적으로 발현되는 섬유아세포를 선발한 결과이다. 배양액은 350 μ g/ml의 농도로 네오마이신을 처리하여 3-4일간격으로 배양액을 교환해주었을 경우, 15일 경과 후 유전자 전이 세포만이 선발된 것을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 초기 유전자 전이 효율이 20-30%이지만 네오마이신 처리에 의한 선발 후에는 90%이상의 세포에서 유전자 발현을 확인할 수 있었다. 이상과 같이 유전자 전이와 안정적 선발을 위한 기본 조건이 확립하였다.

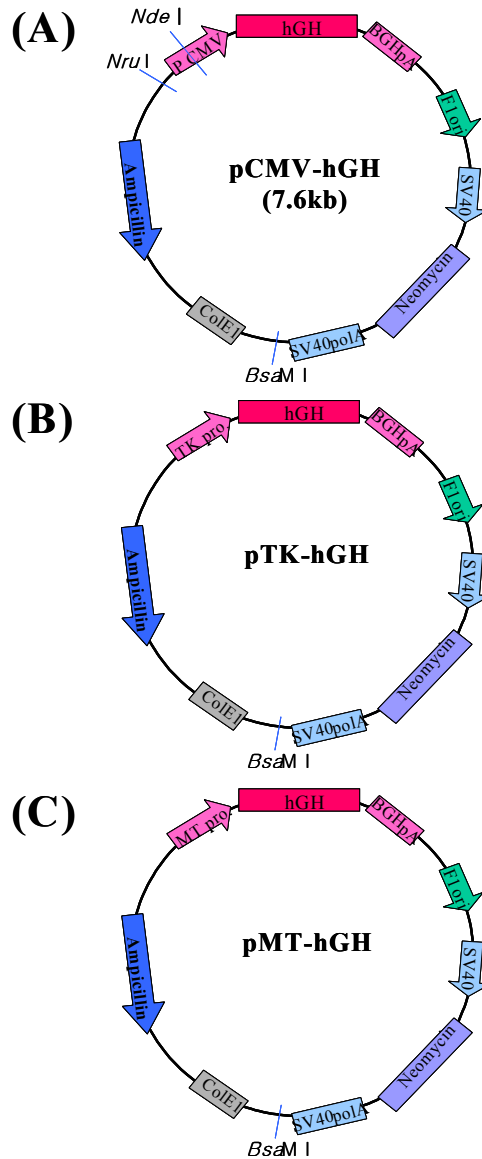


Figure 16. Expression vector maps for human growth hormone (hGH) which regulated by CMV, TK, or MT promoter, respectively.

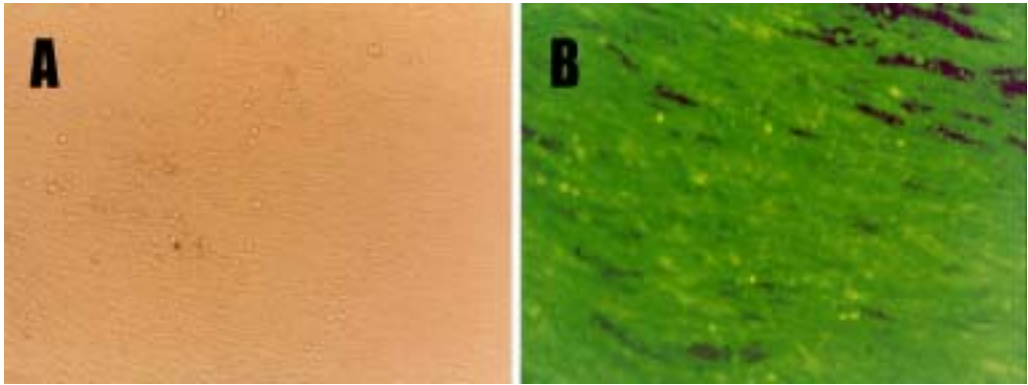


Figure 17. The expression of GFP in chicken embryonic fibroblasts which were selected with $350\mu\text{g/ml}$ G418 for 2 weeks (magnification $\times 100$).

제 6 절 원시생식세포 및 생식 세포주내로 유전자 전이 및 발현 검증

1. 생식세포주로 유전자 전이 및 발현 검증

가. 생식세포주내로 유전자 전이 조건 확립 (리포솜, electroporation)

생식세포주내 유전자 도입을 위하여 전기 충격법 (electroporation)과 리포솜 방법을 사용하였으며, 표지 유전자로는 GFP를 linear form으로 사용하여 살아있는 세포에서도 쉽게 관찰할 수 있도록 하였다. 기존의 전기 충격법 (250V / 950 μ F)에 의한 방법은 초기에는 평균 50%이상의 높은 유전자 전이 효율을 보였으나 (Figure 18) 생식세포주의 지속적인 유지와 계대 배양을 하였을 경우에는 유전자 전이 효율이 급격하게 떨어져 안정적으로 발현하는 콜로니가 형성되지 않았다. 이는 전기 충격법에 의해 전이된 유전자가 안정적으로 유전체내로 삽입 (genome integration)이 되지 않고 episomal form으로 존재하기 때문이라 사료된다. 따라서 전기 충격법을 이용한 유전체내 안정적 삽입을 위한 조건 실험으로 포유류의 마우스 조건을 실험하였다. 즉, 매우 높은 볼트 (voltage)에 낮은 uF을 조건으로 하여 800V / 3, 10, 50 uF (Bio-Rad, gene pulser[®] II)를 검증하였다. 본 실험은 예비 실험 결과를 바탕으로 800V, 50uF 조건으로 하여 OPTI-MEM에 DMSO 첨가, FBS 첨가 및 닭 혈청 첨가 조건으로 하여 유전자 전이 효율과 trypan blue 용액을 이용한 생존율을 측정하였다. 실험 결과 유전자 전이 효율은 평균 16.7~20.2%였으며, DMSO 첨가는 위 조건에서는 유전자 전이 효율에 영향을 주지 않았다. 또한 닭 혈청 이용 역시 FBS 이용에 대한 유전자 효율은 높지 않았다 (Table 5). 따라서 본 실험에서는 안정적인 유전자 전이를 위한 조건으로 800voltage, 50 μ F에 FBS 첨가를 확립하였다. 위 조건의 유전자 전이 효율은 20% 정도이지만 지속적인 배양을 통하여 안정적인 유전자 전이 및 배자생식세포주 콜로니에서도 계속적으로 발현을 나타내는 세포주까지의 획득할 수 있었다 (Figure 19). 이러한 전기충격법에 대한 생존율 측정은 Table 6에 제시하였다. 실험결과 대조구인 81.4%에 비하여 처리구는 80.2 ~ 86.7%로 차이를 나타내지 않았다. 따라서 확립된 높은 전압하에서의 전기충격법은 생존율에는 크게 영향하지 않음을 알 수 있었다.

리포솜을 이용한 방법에서는 상업화되어 있는 lipofectAMINE과 Superfectin을 사용하여 검증하였다. Superfectin를 이용한 유전자 전이 조건은 0.5, 1.0 μ g DNA에 1.0, 2.5, 5.0 μ l Superfectin을 혼합하여 3시간, 3시간 이상 배양함으로써 조건 확립 실험을 수행하였다. 그러나 Superfectin의 경우에는 특히, 원시생식세포에 대하여 매우 강한 독성을 보여 1-2일 후에는 많은 수가 죽어버리는 양상을 나타내었다. lipofectAMINE을 이용한 유전자 전이 조건은 0.5, 1.0, 2 μ g DNA에 1, 2, 4 μ l lipofectAMINE을 혼합하여 3, 5, 7, 10, 12시간 배양함으로써 실험을 수행하였다. lipofectAMINE은 Superfectin에 비해서는 독성이 없었으며 평균 유전자

전이 효율은 17%이었다. lipofectAMINE을 이용한 경우에는 정상적으로 콜로니 형성이 되었으며 생식세포주 형성도 문제가 없었다. 그러나 전기충격법과 동일한 양상으로 생식세포주의 지속적인 유지와 계대 배양을 하였을 경우에는 유전자 전이 효율이 급격하게 떨어져 안정적으로 발현하는 콜로니가 형성되지 않았다. 따라서 lipofectAMINE에 의해서도 아직까지는 전이된 유전자가 안정적으로 유전체내로 삽입이 되지 않고 episomal form으로 존재하는 것으로 생각된다.

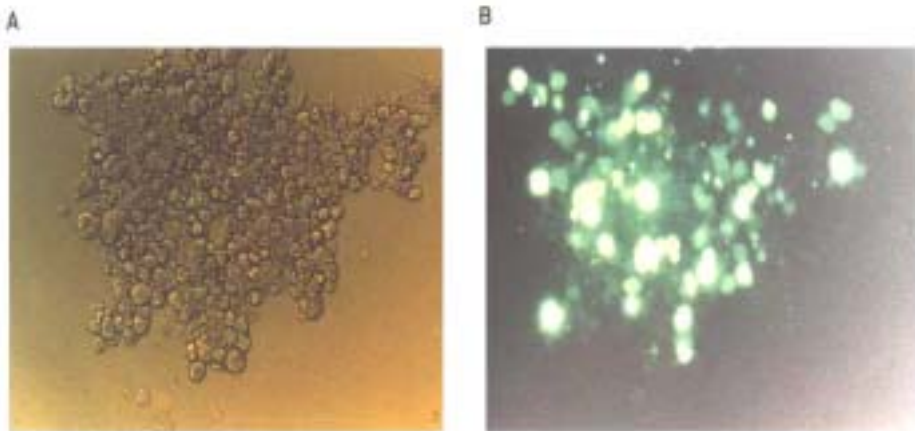


Figure 18. The transfected and cultured gPGCs after Ficoll density centrifugation. (A) A number of gPGCs were collected. gPGCs are round and large size ($\times 100$). (B) After Ficoll density centrifugation, GFP expressing gPGCs were visualized with fluorescent microscope ($\times 100$).

Table 5. Comparison of transfection efficiency on primordial germ cells with different conditions

	1st	2nd	3rd	Ave±SD
OPTI-MEM/FBS/DMSO	18.5	15.7	15.9	16.7±1.6
OPTI-MEM/FBS	17.8	23.2	19.7	20.2±2.7
OPTI-MEM/chicken serum	16.1	18.6	16.9	17.2±1.3

Table 6. Viability of primordial germ cells with different condition after electroporation

	1st	2nd	3rd	Ave±SD
OPTI-MEM/FBS/DMSO	90.3	78.1	91.7	86.7±7.5
OPTI-MEM/FBS	78.5	87.5	82.2	82.7±4.5
OPTI-MEM/chicken serum	82.4	84.1	74.1	80.2±5.4
control (no treatment)				81.4

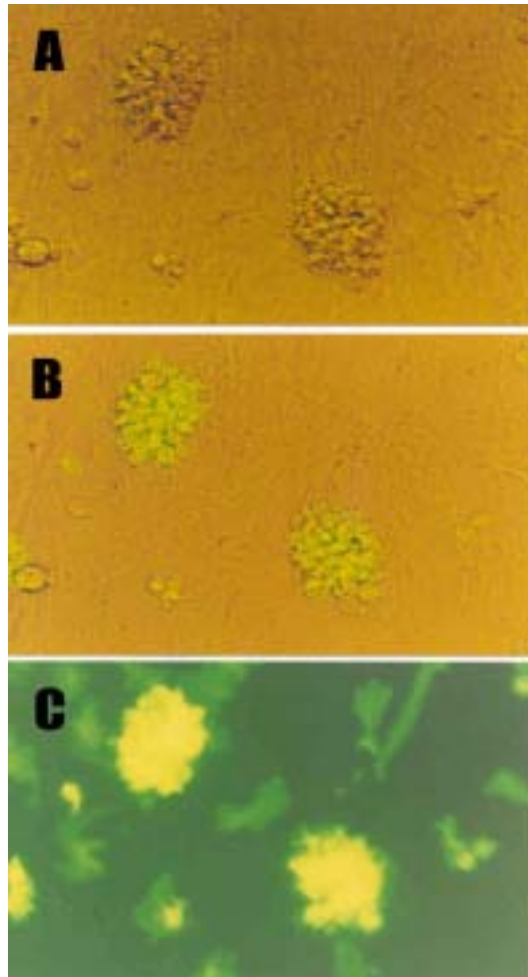


Figure 19. The stable expression in chicken EG cell colonies. The colonies are strongly emitting the green fluorescent light (magnification: $\times 200$)

제 7 절 성계에 대한 체내 직접 주입(direct *in vivo* gene transfer) 조건 확립

1. 벡터의 *in vivo* 발현 검증

가. *in vitro* 배양에서의 외래 유전자 발현 양상 검증

본 실험은 testis를 이용하여 체외 배양을 통한 최적의 유전자 전이 조건을 확립하고자 하였다. 체외에서의 유전자 발현 양상을 검증하기 위하여 두 가지 배양 조건을 이용하였다. 첫 번째로는 testis내의 모든 세포를 single cells suspension으로 분리한 후 세포 배양을 시도하였으며, 두 번째 방법은 single cells suspension 분리 없이 testis 조직을 이용한 tissue culture system 방법을 이용하였다. testis는 성성숙이 완료된 30주령 이상의 개체로부터 채취하였으며, 채취후 PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free)를 이용하여 반복 세척하였으며, 최종적으로 1X antibiotics-antimycotics (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 100 units/ml penicillin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin)가 포함된 PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free)를 이용하여 세척하였다. single cells suspension을 위해서는 testis 조직을 잘게 자른 후 trypsin-EDTA 2회 처리 및 cell strainer를 이용하였으며, 배양 3일 후 리포솜을 이용하여 유전자 전이를 시도하였다. 유전자 전이를 위한 DNA와 리포솜 비율은 1:10 (2 μg :20 μg , 4 μg :40 μg [w:w]), 1:20 (2 μg :40 μg [w:w]) 조건을 이용하여 확립하였다. 그러나 본 실험은 testis 조직내 세포가 너무 heterozygous하여 정확한 세포 형태를 구분하기가 어려웠으며, 세포들끼리 뭉치는 cell aggregation이 생성되었다. 또한 trypsin-EDTA 및 물리적인 충격에 의한 cell death가 많이 발생하여 정확한 유전자 전이 효율 측정이 어려웠다. 두 번째 방법으로 testis tissue culture 방법은 현재 체외 배양 조건 확립하였다. 본 실험 직접 주입과 아울러 testis 조직에 직접 외래 유전자를 전이하고 체외 조직 배양을 함으로써 *in vivo*에서 외래 유전자 전이 및 발현 양상을 확인하기 위하여 수행하였다. 성계로부터 testis를 적출하여 가로 0.5cm, 세로 0.5cm로 절단하였으며, 체외 배양을 위한 기본 배지는 DMEM을 사용하였으며, 5% FBS, 5% chicken serum, 1X antibiotics-antimycotics (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 100 units/ml penicillin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin)를 첨가하였다. 위의 조건에 의한 배양중에 Lac Z 유전자를 주입 및 리포솜과 혼합하여 주입하였다. 사용된 리포솜 LipofectAMINE Plus (Gibco BRL)와 FuGene (Roche)를 이용하였으며, 사용한 양 및 비율은 Table 7과 같다. 실험 결과, LipofectAMINE Plus를 사용한 경우가 유전자 전이가 가장 높게 나타났으며, 리포솜을 혼합하지 않은 경우에도 발현이 관찰되었다 (Figure 20). 그러나 외래 유전자를 주입하지 않은 경우에는 X-gal에 의한 발색 반응이 나타나지 않았다 (Figure 20). 따라서 본 실험의 결과로 볼 때, 조직으로의 직접 주입에 위해서도 외래 유전자 전이 및 발현이 가능함을 알 수 있었으며, 동일 조건을 *in vivo*에 적용할 경우에도 유사한 결과가 도출 것으로 사료된다. 따라서 이러한 방법을 통하여 전

이된 외래 유전자가 testis내에 일반 체세포뿐만 아니라 정자 형성 (spermatogenesis) 과정의 정자 세포에서 발현이 관찰될 경우에는 확립된 본 조건을 이용할 경우 형질전환 개체가 생산될 수 있을 것으로 예상된다.

나. 성계에 대한 체내 직접 주입 (direct *in vivo* gene transfer) 조건 확립

성계에 외래 유전자 직접 주입 실험은 우선, 성성숙 후 생식기내 직접 주입을 위한 기본 조건을 확립하였다. 성계 생식기내 직접 주입을 위하여 확립된 조건은 수컷의 testis내로의 주입 방법 가능성을 검증하였다. 이는 수컷의 경우 안정적인 testis내 주입 조건을 확립할 경우 체내에서의 정자 형성 과정 중에 분열을 통하여 유전체내로의 외래 유전자 삽입이 가능할 것으로 예상되며, 이를 이용한 인공 수정 방법으로 형질전환 개체 생산이 가능할 것으로 예상되기 때문이다. 그러나 암컷의 경우에서 다량의 난황이 존재하고 난자의 정확한 위치 파악이 어려울 뿐만 아니라 수적으로도 적은 수가 존재하기 때문에 접근 방법이 쉽지 않을 것으로 예상된다. 수컷에 대한 직접 주입 방법은 늑골 (肋骨)에서의 접근 방향과 견갑골 (肩甲骨)에서의 접근 방향으로 주입하는 두 방법을 확립하였다. 그 외에 등쪽에서의 접근 방법은 장골 (腸骨)에 의해 testis내로의 접근이 불가능하였으며, 복부 방향으로 접근 방법은 장내의 많은 외상을 초래할 위험이 존재하였다. 첫 번째 방법으로, 견갑골 (肩甲骨)을 통한 주입 방법은 염색 시료를 이용하여 성공적으로 수행하였다. 그러나 제 3-4 늑골 (肋骨) 또는 제 4-5 늑골 (肋骨) 사이를 통과하여 주입시, 가장 큰 문제는 허파를 관통하여 외상을 유발하는 경우가 발생하였으며, 또한 testis 주입을 위한 injection needle의 충분한 각도를 확보할 수 없는 문제가 발생하였다. 또한, 본 실험에 사용된 injection needle은 Hamilton gage 17 needle로써 주입시 직접적인 외상을 줄이기 위한 작은 gage needle의 필요성도 제고하였다. 두 번째 방법으로 측면에서의 외검상돌기 (外劍狀突起) 상부 (上部)의 제 5-6 늑골 (肋骨)사이에 주입하는 방법을 확립하였다. 측면에서의 접근 방법은 주입에 따른 직접적인 외상이 가장 적었으며, 또한 testis내로의 성공 확률도 가장 높았다. 따라서 성계에서의 체내 직접 주입 방법으로는 측면부로의 주입 방법을 확립하였다. 현재 확립된 조건과 *in vitro* 조직 배양에서 확립된 LipofectAMINE 혼합 조건을 이용하여 외래 유전자 주입 실험을 진행하였으며, 이를 이용한 외래 유전자를 주입한 실험축을 조성하였다.

Table 7. The mixture ratio of DNA and liposomes for transferring the foreign gene into testicular cells in chicken

	DNA	liposome	ratio
LipofectAMINE Plus	1 μ g	4 μ l	1 : 4 (w/v)
FuGene	1 μ g	1 μ l	1 : 1 (w/v)

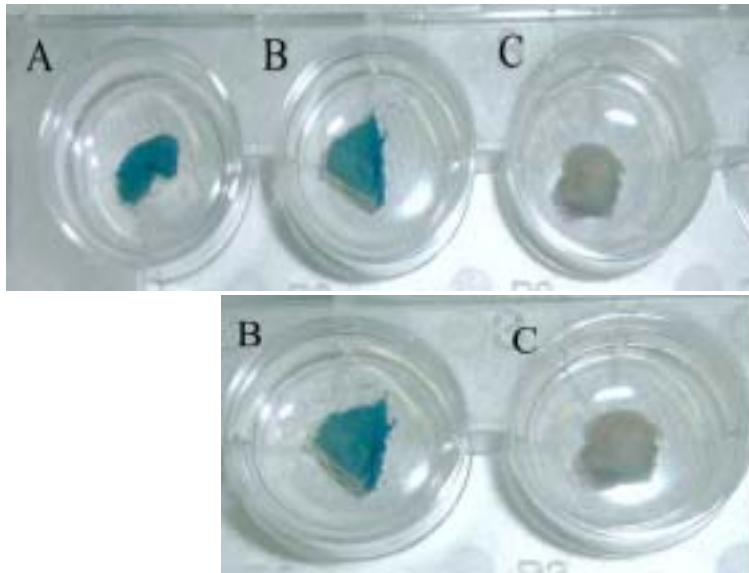


Figure 20. Chicken testis after injection of Lac Z and X-gal staining. A) Circular form of plasmid B) Linearized form of plasmid (digested with Sca I) C) control (no treatment)

제 8 절 형질전환 개체 생산 (원시생식세포/생식세포주)

1. 유전자를 전이한 원시생식세포 및 EG cell 주입에 의한 생식선 카이메라 생산

본 실험에서는 장기배양을 통한 EG cells 확립에 의한 실험축 조성과 더불어 유전자 전이 후 3일 단기 배양 및 G418 350ug/ml을 사용하여 단기간 선발 10일 배양과 장기간 배양 20일 배양을 통한 실험축 조성도 함께 구축하였으며, 이에 대한 후대 검정을 수행하였다. 실험축 조성을 위한 유전자로는 표지유전자 (reporter gene)로써 CMV-EGFP를 사용하였으며, 성장 촉진 관련 유전자로써는 성장 촉진을 위한 발현 벡터인 MT-hGH (mouse metallothionein promoter + human growth hormone)를 사용하였다. 실험축 조성은 본 연구실에서 확립된 방법을 이용하여 수행하였다. 즉, 5.5일령 오골계 배아의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하고 전기충격법 (electroporation)을 이용하여 유전자를 전이하였다. 3일 단기 배양과 10일 neomycin 선발에 의한 조성된 실험 축으로부터는 안정적인 생식선 카이메라를 생산할 수 있다. 따라서 이로부터 생산된 카이메라에 대한 유전자 분석을 수행하였다. 3일 단기 배양을 통한 실험축 중에 현재 후대 검정을 수행하고 있는 개체는 표지 유전자 전이 개체 ♂ 16수, ♀ 28수 전체 44수이며, 성장 촉진을 위한 발현 벡터인 MT-hGH (mouse metallothionein promoter + human growth hormone) 전이 개체의 경우에는 ♂ 22수, ♀ 26수 전체 48수에 대하여 수행 중에 있다 (Table 8).

2. 형질전환 닭의 유전자 발현 분석

가. 형질전환된 닭의 외래 유전자의 안정적 삽입 분석

외래 유전자 전이에 의한 형질전환 개체의 안정적 삽입 분석은 Southern blotting을 이용하여 진행 중에 있다. 초기에서 DIG-alkaline phosphatase를 이용하여 연구를 수행하였으나 sensitivity의 문제로 인하여 정확한 유전자 검출이 어려웠다. 이후 방사성 동위원소를 이용한 유전자 탐색 조건을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 10pg까지의 외래 유전자 존재 여부를 검출할 수 있는 조건을 확립하였으며, 앞으로 보다 높은 sensitivity로 탐색할 수 있는 조건 확립을 위한 실험을 수행하고 있다. 이는 cyber green dye 등을 이용한 외래 유전자 검출 및 정량 조건을 확립 중에 있다. 따라서 본 조건이 확립되면 짧은 시간에 높은 정확도로 외래 유전자의 검출이 가능할 것으로 사료된다.

나. 표지 유전자 전이 형질전환 개체 생산 분석

표지유전자 전이 원시생식세포를 이용하여 생산된 생식선 카이메라의 자손에 대한 유전 분석을 진행하고 있다. 사용된 표지 유전자 벡터는 CMV-EGFP와 SV40-Neo를 이용하여 실험축 조성 및 생식선 카이메라로부터 생산된 자손을 검증하였다. 그러나 생산 자손에 대한

PCR 분석과 Southern blotting 결과로 볼 때, 아직까지 안정적으로 외래 유전자가 전이된 형질전환 개체는 생산되지 않았다. 앞으로 발생하는 자손에 대한 유전 분석을 통한 개체 생산 및 발현 양상 분석을 진행해야 할 것으로 생각된다.

다. 성장 촉진 유전자 전이 형질전환 개체 생산 분석

성장 촉진 유전자 발현 벡터 (MT-hGH : mouse metallothionein promoter + human growth hormone)를 전이한 원시생식세포를 주입하여 생산된 생식선 카이메라의 자손에 유전 분석을 수행하고 있다. 현재까지 표지 유전자 및 성장 호르몬 유전자 주입에 의해 생산된 120수 이상의 실험축 조성을 조성하였으며, 이로부터 생산된 자손들에 대한 유전 분석을 수행 중에 있다. 분석 결과 성장 촉진 유전자가 전이된 형질전환 개체 생산은 확인되지 않았으며, 앞으로 생산되는 자손에 대한 유전 분석을 좀더 수행해야 할 것으로 생각된다.

라. 성장 촉진 전이 닭 계통 조성 및 능력 검증

조성된 실험축의 검정 교배 및 생산된 생식선 카이메라의 자손에 대한 유전 분석에 의하여 검증된 형질전환 닭이 생산된 경우, 효율적인 교배를 통하여 계통 조성을 확립할 것이며, 확립된 계통에 대한 능력 검정을 수행할 수 있을 것으로 예상된다.

Table 8. The summary of progeny-tested stocks for production of germline chimeras and transgenic chickens.

stocks		sexuality		total
		♂	♀	
reporter gene (GFP)		16	28	42
growth hormone (MT-hGH)		22	26	48
EG cells (reporter gene : GFP)	P ₁ EG cells	11	11	22
	P ₂ EG cells	2	4	6
	P ₃ EG cells	1	2	3

제 9 절 레트로바이러스를 이용한 형질전환 개체 생산

1. 팬트로픽 레트로바이러스 (pantropic retrovirus) 발현 벡터 제작

팬트로픽 레트로바이러스 발현 벡터는 표지 유전자로 LacZ를 이용하였으며, 성장 촉진을 위해서는 인체 유래 성장 호르몬 (human growth factor, hGH)을 이용하였다. 바이러스 벡터는 pLXRN을 사용하였으며, 성장 호르몬은 CMV 프로모터에 의하여 발현을 조절하였다. (Figure 21). 성장 호르몬은 제한 효소 *Nru* I을 처리하여 blunt end로 제작하고 *Bsa*M I을 처리하여 sticky end를 각각 제작하였다. pLXRN의 경우에는 *Hpa* I을 처리한 후 blunt end로, *Bsa*M I로 sticky end를 하여 36°C에서 overnight ligation을 수행하였. 제작된 발현 벡터는 9.5kb였으며, LTR 부위에 CMV 프로모터와 인체 성장 호르몬 및 네오마이신 분해 유전자를 포함하도록 제작되었다 (Figure 21). 제작된 레트로바이러스 발현 벡터는 *Nde* I 제한 효소를 처리하여 6kb와 3.5kb 밴드를 확인함으로써 제작을 완료하였다 (Figure 22). Figure 22와 Table 9에서는 PCR에 의한 외래 유전자 검출을 위한 프라이머 위치 및 프라이머 염기 서열을 함께 제시하고 있다.

2. 세포주내로 hGH 레트로바이러스 감염 및 titering 측정

제작된 hGH 레트로바이러스 벡터의 발현 양상 및 titer 측정을 위하여 닭 배아 섬유아세포 (chicken embryonic fibroblasts, CEFs)와 NIH3T3에 각각 생산된 바이러스를 감염시킨 후 media soup을 샘플링하여 ELISA를 통한 hGH 생산량을 측정함으로써 발현 양상과 간접적으로 titering을 측정하였다. 기초 데이터로써 성장 호르몬 표준 곡선 값은 $R^2=0.9994$ 를 나타내었으며 (Figure 23), 실험 결과 NIH3T3, CEFs, GP293에서 각각 547.6 ± 7.2 , $7,950 \pm 1,484.9$, $2,142.9 \pm 1,208.2$ pg/ml을 나타내었다. 본 실험 결과를 볼 때, CEFs에서 NIH3T3, GP293에 비하여 가장 높은 값을 나타내어 제작된 발현 벡터가 형질전환 가금 생산을 위하여 적합하게 사용될 수 있을 것으로 판명되었다. 이는 성장 호르몬 발현 벡터가 닭 세포로부터 정상적으로 발현하여 기능을 가지고 있음을 제시하고 있다. 이러한 예비 결과를 기초로 하여 titering을 높이고자 바이러스를 농축하여 사용하였다. 농축한 바이러스를 이용하여 CEF와 NIH3T3에서의 측정값은 평균 CEFs에서 178.8 ± 76.4 ng/ml, NIH3T3에서 152.3 ± 44.0 ng/ml을 나타내었으며, 99ng/ml~335ng/ml 정도의 발현량을 나타내고 있다 (Figure 24). 따라서 본 연구실에서는 이를 이용한 실험축 조성 및 형질전환 닭 생산에 이용하였다.

3. 농축 레트로바이러스의 수용체 배자내 미세주입

형질전환 가금 생산 모델 시스템을 확립하기 위하여 레트로 바이러스를 이용한 실험축 조성을 수행하고 있다. 본 실험에서 사용한 레트로 바이러스는 팬트로픽 (Pantropic

retrovirus)를 사용하여 보다 안정적이고 고효율의 형질전환 가금 생산 모델 시스템을 구축하고자 하였다. 또한, 기존의 방법은 레트로 바이러스를 배반엽 세포층 (blastodermal layer)에 주입하는 방법을 사용하였으나, 생식선으로의 유전자 전이 효율이 낮고 부화율이 현저하게 감소한다는 문제점이 존재하였다. 이를 극복하기 위하여 본 연구실에는 새로운 방법적 접근을 시도하고 있다. 고농축에 의한 높은 titer를 유도하여 배반엽 세포층 주입이 아닌 초기 배자 원시생식세포가 혈관을 통하여 순환하고 있는 시점인 배양 50-55시간의 배자의 혈관에 미세주입하는 방법을 확립하였다. 이는 순환 중인 원시생식세포를 레트로 바이러스에 infection 하게 함으로써 다른 조직으로 유전자 전이에 의한 부화율 감소를 유도할 수 있으며, 또한 원시생식세포를 주대상으로 하기 때문에 높은 생식선 전이 효율을 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 방법은 결론적으로, 1) 바이러스의 미세 주입의 용이성, 2) 높은 titer의 바이러스 미세주입 가능, 3) 높은 발생율 등의 장점을 나타내었다. 이러한 방법의 검증을 위하여 농축한 LacZ 바이러스를 이용하여 확립된 실험축 중 일부를 도태하여 외래 유전자의 전이 유무를 판명하였다. 발생 후 병아리에서의 PCR 결과, 심장, 간, 근육, 근위, 정소, 난소 등에서 외래 유전자가 전이되어 검출되었다 (Figure 25). 특히 정소 및 난소에서 외래 유전자가 검출됨으로써 생식선 전이가 가능할 것으로 추정된다. 실험 결과에서 심장, 근육, 난소 등에서의 외래 유전자 검출은 예상되었지만, 근위에서도 상당히 강한 PCR 밴드 양상이 나타났다 (Figure 25). 이는 근위의 배발달 초기의 형성 과정 및 정확한 과정을 좀더 밝혀야 해석이 가능할 것으로 생각된다. 또한 발생 후 10주령에서 일부 실험축을 도태하여 각각 조직별로 PCR에 의한 유전자 분석을 실시하였다. 10주령 암, 수 각각 한 마리씩을 도태하여 혈액 (blood), 근위 (gizzard), 심장 (heart), 간 (liver), 근육 (muscle), 정소 (testis), 난소 (ovary)에서 genomic DNA 추출 후 PCR 분석을 하였다. PCR 결과 LacZ 외래 유전자가 각각의 프라이머에 대한 band density를 약간씩 차이가 있더라도 두 개체 모든 조직에서 검출되었다 (Figure 26). 이러한 결과는 바이러스를 혈관내 주입하더라도 대부분의 조직에 감염되며 배발달 및 발생 후에도 지속적으로 유지되고 있음을 제시하고 있다. 이러한 방법으로 조성된 실험축이 성성숙에 도달한 후 다음 세대로의 유전자 전이 여부를 검증하였다. 우선 성성숙에 이른 숫컷에 대하여 정액을 채취한 후 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 실시하였다. PCR 분석 결과 밴드 양상은 조금씩 차이가 있었으나 모든 개체의 정액에서 외래 유전자가 검출되었다 (Figure 27). 따라서, 이를 이용한 다음 세대에서의 형질전환 개체 생산이 가능할 것으로 예측되었다. 성성숙후 일부 폐사 개체에 대한 유전 분석도 실시하였다. 이는 일부 폐사된 암수 개체의 생식기를 적출하여 유전 분석을 실시함으로써 다음 세대로의 전이 가능성을 검증하고자 하였다. 실험 결과 성성숙후 숫컷의 정소와 암컷의 난소 모두에서 강한 PCR 밴드 양상을 보임으로써 주입한 외래 유전자가 생식선으로도 전이되었음을 제시하고 있다 (Figure 28). 최종적으로 형질전환 가금을 생산하기 위하여 검정 교배를 통한 다음 세대에서

의 유전 분석을 실시하였다. 검정교배를 실시한 실험축은 Table 10과 같다. 500배로 농축한 바이러스를 배반엽 세포층에 주입한 전체 177개체 중 발생은 6마리로 3.4%였으며, 이이 검정교배를 실시한 개체는 2수 (♂ 1수, ♀ 1수; 1.1%)였다. 본 연구실에서 개발한 방법인 농축한 바이러스를 혈관에 주입한 경우에는, 전체 주입 61개체 중 발생 개체는 31수로 50.8%였으며, 검정교배는 16수 (♂ 4수, ♀ 12수; 26.2%)였다. 이상의 결과로 볼 때, 번 실험실에서 확립한 방법이 고농축의 바이러스를 많은 양을 쉽게 주입할 수 있었으며, 또한 발생율에서도 월등하게 높음을 알 수 있었다 (3.4% vs. 50.8%). 따라서 확립된 방법은 적은 수의 배자를 처리하더라도 효율적인 실험축 조성을 가능하게 하였다. 이러한 검정교배를 통하여 생산된 각각의 자손에 대해서는 혈액 또는 feather pulp로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 함으로써 형질전환 개체 여부를 판단하였다. PCR 분석 결과 많은 개체에서 다음 세대로의 외래 유전자의 안정적인 전이를 확인할 수 있었다 (Figure 29). 현재까지 검색한 결과는 전체 검정교배 18수 (배반엽 주입 개체 2수, 혈관내 주입 개체 16수) 중 14수의 자손에서 PCR에 의한 외래 유전자가 검출되었으며 (14/18, 77.8%), 전체 분석 자손 250수 중 65수 (26.0%)가 PCR 분석에 의해 외래 유전자가 검출되었다. 개체별 자손에 대한 PCR 분석 결과는 Table 11에 제시하였다. 이상의 결과는 현재까지 레트로 바이러스를 이용한 형질전환 가금 생산에 대한 연구 보고에 비하여 매우 월등한 결과이다. 즉, 레트로바이러스를 이용한 주입의 용이성, 고농축 바이러스 사용 가능, 높은 발생율 등은 현재까지 보고된 형질전환 가금 생산 방법보다 매우 효율적인 방법을 확립하였음을 제시하고 있다. 현재 Southern blotting을 이용하여 보다 정확한 외래 유전자의 유전체내 삽입 여부를 검증하기 위한 실험을 진행 중에 있다.

이와 같이, 기초 실험과 데이터를 바탕으로 하여 본 실험실에서 제작한 인체 유래 성장 호르몬과 레트로 바이러스 시스템을 이용하여 실험축을 조성하였으며, 배발달 단계 및 성숙후 교배 조합 및 외래 유전자 검출을 통하여 형질전환 개체 생산을 위한 검증을 진행 중에 있다.

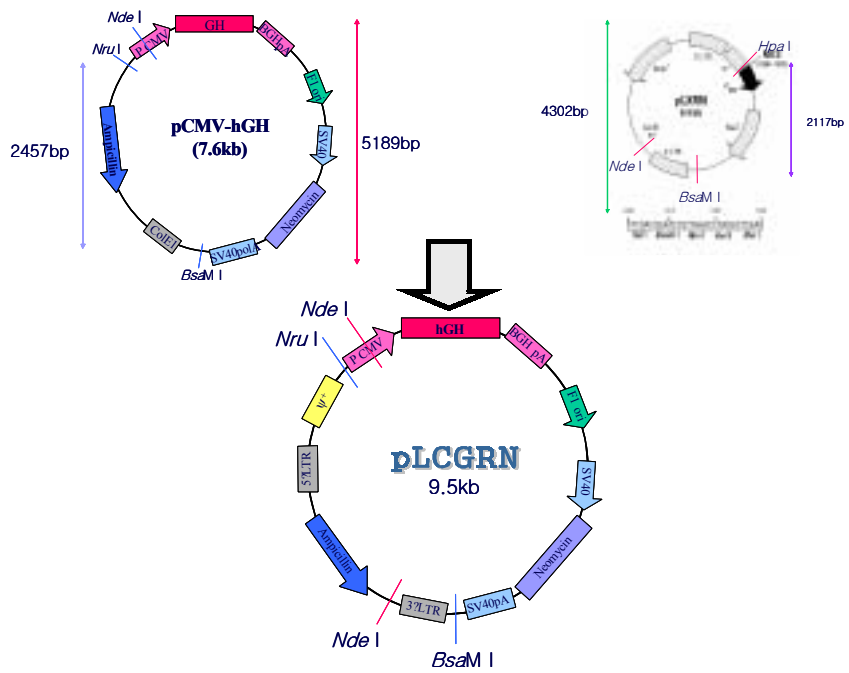


Figure 21. Retroviral vector construct for expression of human growth hormone (hGH)

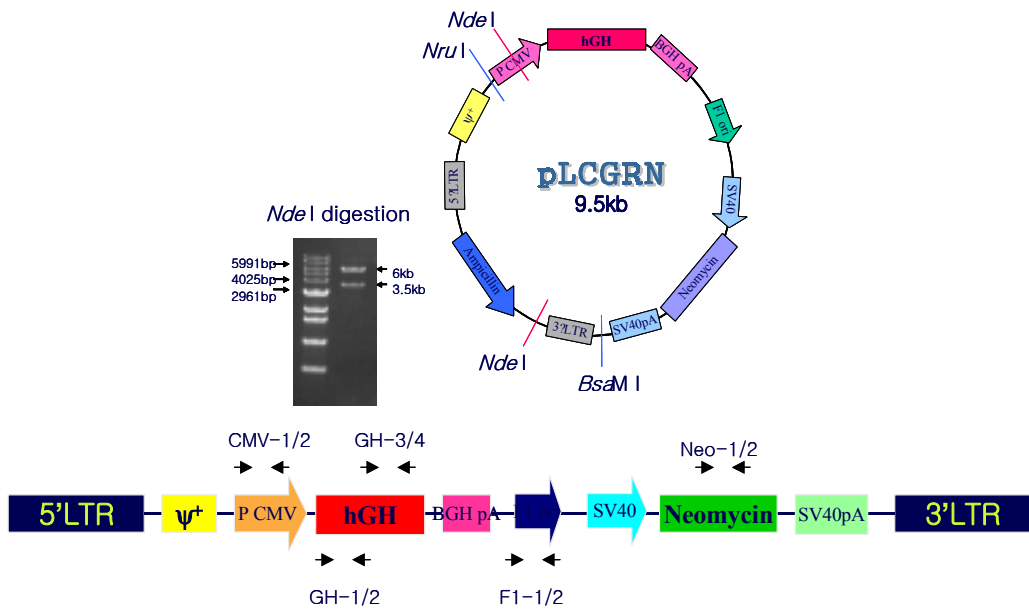


Figure 22. Retroviral vector construct (pLCGRN) and the strategy of PCR analysis for the detection of transgene.

제 10 절 레트로바이러스를 이용한 성장 촉진 형질전환 개체 생산

1. 성장 촉진 형질전환 개체 생산

본 연구실에서 제작한 인체 성장 촉진 유전자 발현 펜트로픽 레트로바이러스 벡터에 대한 PCR 분석을 위한 프라이머 조건 확립 및 회색에 의한 PCR 감도 (sensitivity)를 검증하였다. 본 연구실에서 제작한 프라이머의 경우 hGH1/2와 hGH3/4 모두 0.1pg (100fg)까지 증폭할 수 있는 감도를 나타내었다 (Figure 30). 성장 촉진 형질전환 개체 생산을 위해서는 초기 배발달부터 발생까지 연속적으로 유전자 전이 여부를 검증하였다. 이는 앞서 본 연구실에 확립된 배자 초기 혈관내 미세주입 방법을 이용하는데 있어서 기능성 유전자 (인체 성장 호르몬, hGH)의 배발달 과정에서의 발현에 의한 영향이나 초기 배발달 과정에서의 유전자 전이 여부를 검증하기 위하여 수행하였다. 본 실험은 배자 6일령, 12일령, 발생 과정에서의 각각의 조직에서 인체 성장 호르몬 유전자 전이 여부를 PCR 분석에 의해 수행하였다. 6일령 배자에서 혈액 (blood), 심장 (heart), 간 (liver), 근육 (muscle), 근위 (gizzard), 원시생식기 (gonads)를 적출한 후 genomic DNA를 추출하였다. PCR 분석 결과, 전반적으로 모든 조직에서 hGH 유전자를 검출할 수 있었으며 원시생식기에서도 성공적으로 hGH 유전자가 전이되었음을 확인하였다 (Figure 31). 그러나 특이하게 앞서 LacZ와의 경우와 비슷하게 6일령 배자에서도 근위에서 상대적으로 강한 밴드 양상을 나타내었다. 12일령의 경우에서도 각각 혈액 (blood), 심장 (heart), 간 (liver), 근육 (muscle), 근위 (gizzard), 원시생식기 (gonads)를 적출한 genomic DNA를 추출하였다. PCR 분석 결과는 6일령과 유사하였으나 상대적으로 심장과 간에서 유전자 검출이 강하게 나타났다 (Figure 32). 최종적으로 발생 후 개체에 있어서 3쌍의 프라이머로 각각의 조직에서의 hGH 유전자 전이 여부를 분석하였다. PCR 결과는 모든 프라이머에서 유사하게 나타났으며, 거의 모든 조직에서 검출이 되었다 (Figure 33, 34, 35). 이는 앞서 표지 유전자인 LacZ를 사용하였을 때와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 표지 유전자뿐만 아니라 기능성 유전자에 있어서도 본 연구실에서 확립한 방법이 적용될 수 있음을 제시하고 있다. 추가적인 실험으로 PCR 산물에 대한 정확성을 검증하기 위하여 PCR 산물에 대한 Southern blotting을 수행하였으며, 실험 결과 PCR 분석과 동일한 결과가 도출되어 레트로바이러스에 의해 전이한 hGH이 정상적으로 수용체 배자에서 유전체내로 삽입되었음을 알 수 있었다 (Figure 36). 현재까지 PCR 및 Southern blotting으로도 대하여 분석한 결과는 Table 12에 제시하였으며, 이와 같은 방법으로 조성된 실험축은 Table 13와 같다. 현 실험축은 아직 성성숙에 도달하지 않아 검정교배를 수행하지는 않았으며, 성성숙 후 빠른 시일내에 자손에 대한 유전 분석 및 형질전환 개체 생산이 가능할 것으로 예측된다.

Table 9. Primer sequences for PCR analysis of human growth hormone-expressed retroviral vector

Name	Sequences	Product size	Target gene
GH1	5'- TACTGCTTCAGGAAGGACAT- 3'	437bp	hGH
GH2	5'- ACAAAAATTAGCTGAGCCTG-3'		
GH3	5'- AGAAAAACAAACAGCTCCTG- 3'	337bp	hGH
GH4	5'-ACCCTGAGCTCCTTAGTCTC- 3'		
neo1	5'-TTCTTTTTGTCAAGACCGAC- 3'	464	Neo resistance gene
neo2	5'-ATTTTCCACCATGATATTCG-3'		

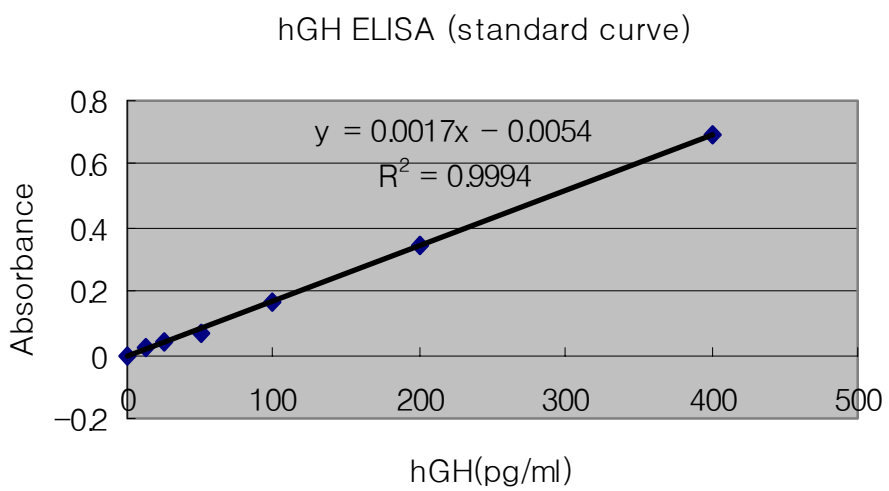
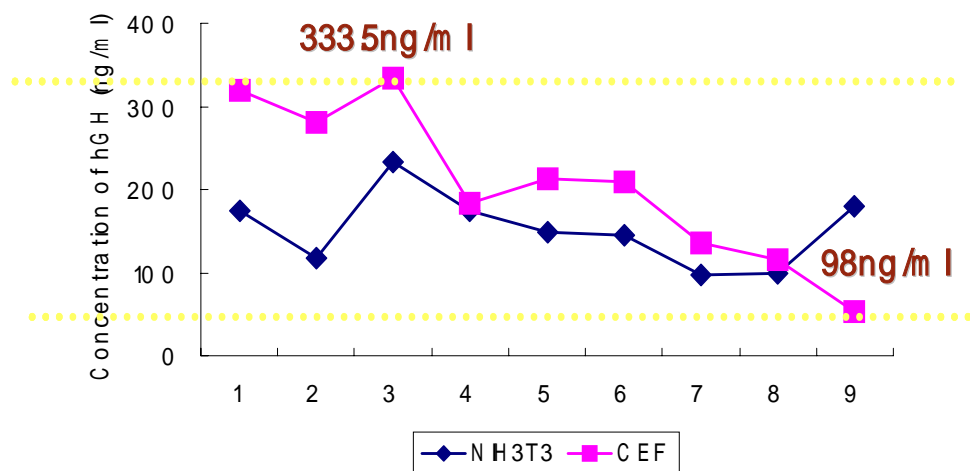
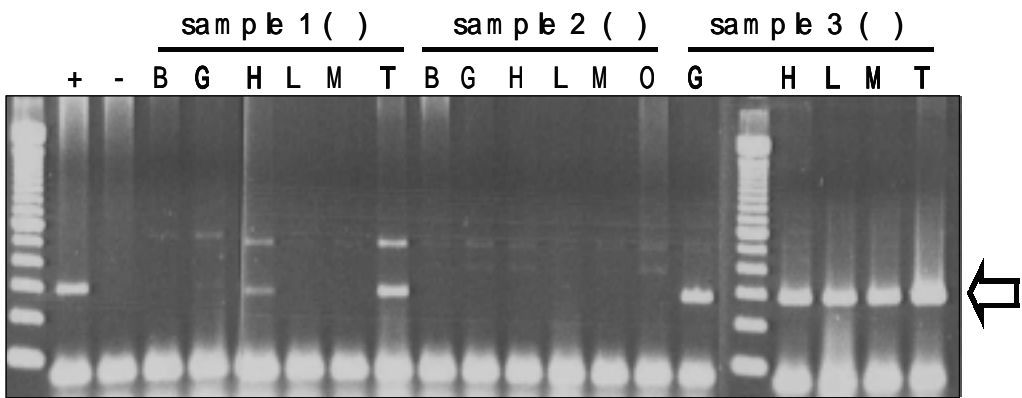


Figure 23. The standard curve of human growth hormone (hGH) concentration by ELISA.



Target cell	Post-concentrated hGH (ng/ml)
NIH3T3	152.3 ± 44.0 ng/ml
CEF	178.8 ± 76.4 ng/ml

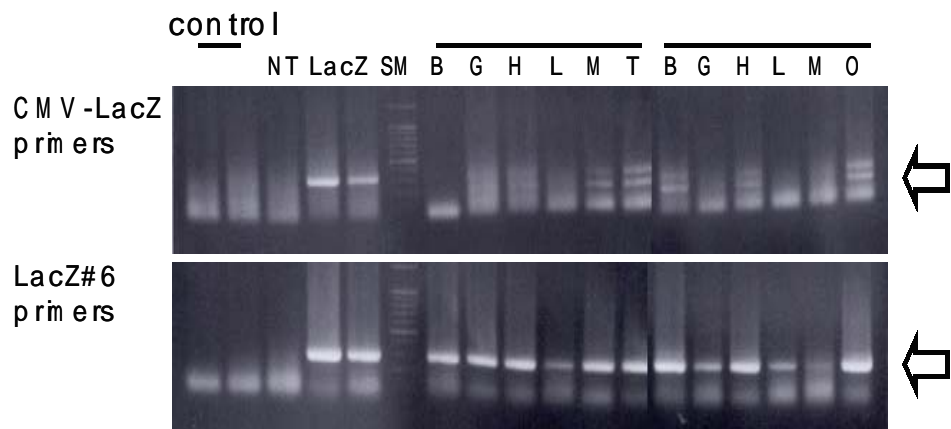
Figure 24. The measurement of human growth hormone (hGH) concentration after infection of CEFs or NIH3T3 by ELISA.



+ : positive control, - : negative control

B : b o d , G : g i z z a r d , H : h e a r t , L : l i v e r , T : t e s t i s , O : o v a r y

Figure 25. PCR analysis of hatched chicks by specific primer set for LacZ gene. Sample #1 and 3 were male and Sample #2 was female.



NT : negative control (no template), SM : size marker (100 bp ladder)
 B : body, G : gizzard, H : heart, L : liver, M : muscle, T : testis, O : ovary

Figure 26. PCR analysis of the sacrificed 10-week-old chickens by specific primer sets for LacZ gene. CMV-LacZ and LacZ#6 primer sets were used for the detection of foreign LacZ gene.

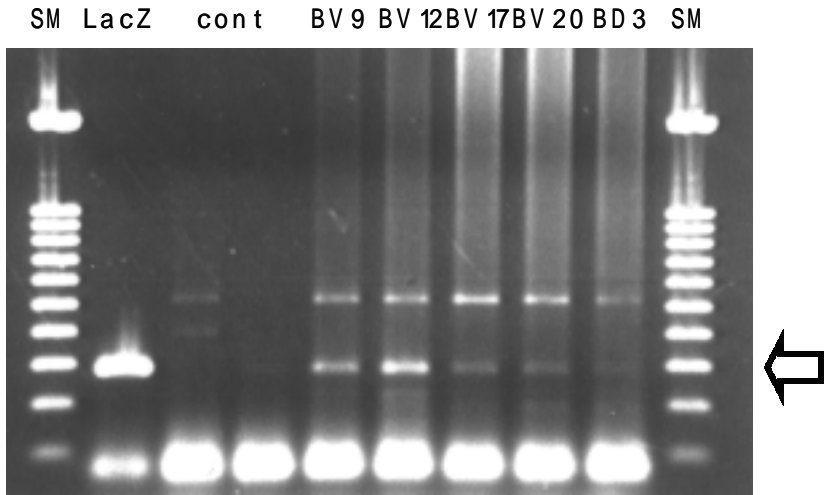


Figure 27. PCR analysis of the sexually matured chickens by specific primer sets for LacZ gene. Semen was collected from male chickens and genomic DNA were isolated for the detection of foreign LacZ gene.

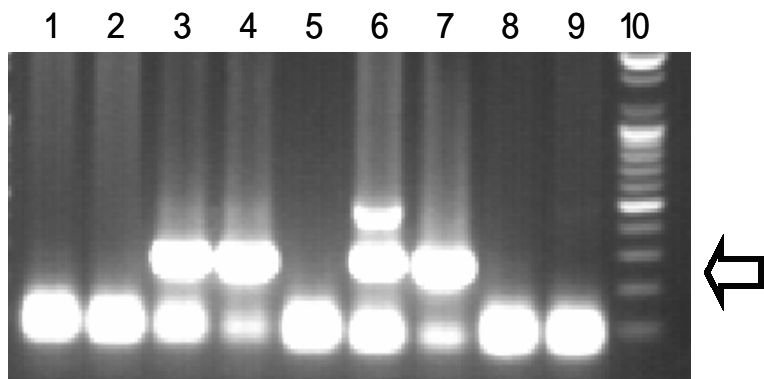


Figure 28. PCR analysis of the sexually matured chickens. The genomic DNA was isolated from male BV-7 testis and female BV-26 ovary, and then PCR amplification was performed with specific primer sets for LacZ gene.

1 : male genomic DNA, 2 : female genomic DNA,

3 : 1pg DNA (plasmid), 4 : 10pg DNA (plasmid)

5 : non-DNA (plasmid), 6 : BV-7 testis

7 : BV-26 ovary, 10 : 100bp ladder

Table 10. The hatchability and number of progeny-tested stocks after sexual maturation, which produced by transferring the concentrated (500x) pantropic retrovirus into blastodermal layer or blood vessel.

Injected site	Injected no.	Hatched no. (%)	No. (%) of progeny-tested
Blastoderm	177	6 (3.4%)	2 (1.1%) [♂ 1 / ♀ 1]
Blood vessel	61	31 (50.8%)	16 (26.2%) [♂ 4 / ♀ 12]
Total	238	37 (15.5%)	18 (7.6%)

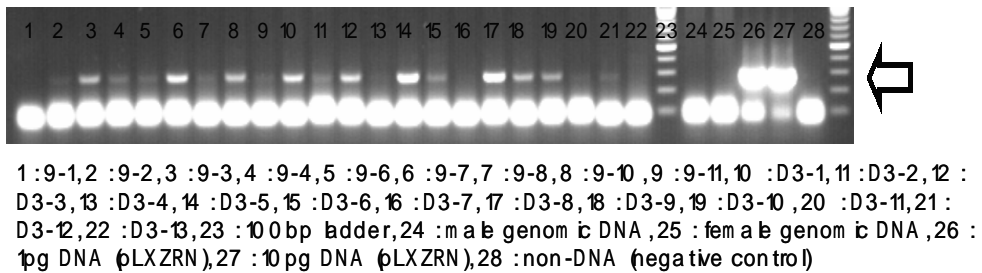
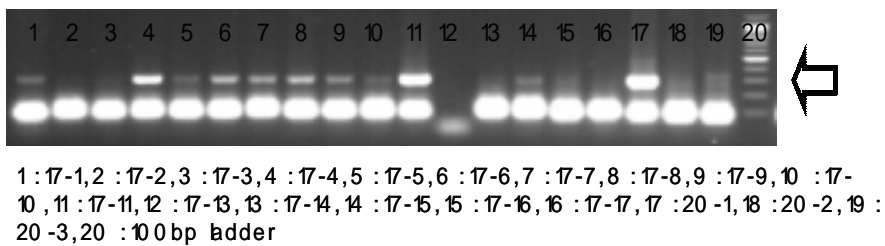


Figure 29. PCR analysis of progenies produced from the founder (F_0). Primer set was specifically amplified on the foreign LacZ gene.

Table 11. PCR analysis of progenies produced from the individual founder (F₀).

ID no.	Total no. of PCR-analyzed progenies	No. of PCR-positive individuals (%)
BV 4	14	3 (21.4%)
BV 5	9	6 (66.7%)
BV 6	1	0 (0.0%)
BV 7	4	2 (50.0%)
BV 9	39	12 (30.8%)
BV11	16	3 (18.8%)
BV12	10	0 (0.0%)
BV14	11	0 (0.0%)
BV16	10	5 (50.0%)
BV17	39	14 (35.9%)
BV19	7	1 (14.3%)
BV20	24	2 (8.3%)
BV21	1	0 (0.0%)
BV22	17	1 (5.9%)
BV23	12	0 (0.0%)
BV29	5	1 (20.0%)
BD 1	3	1 (33.3%)
BD 3	28	14 (50.0%)
Total	250	65 (26.0%)

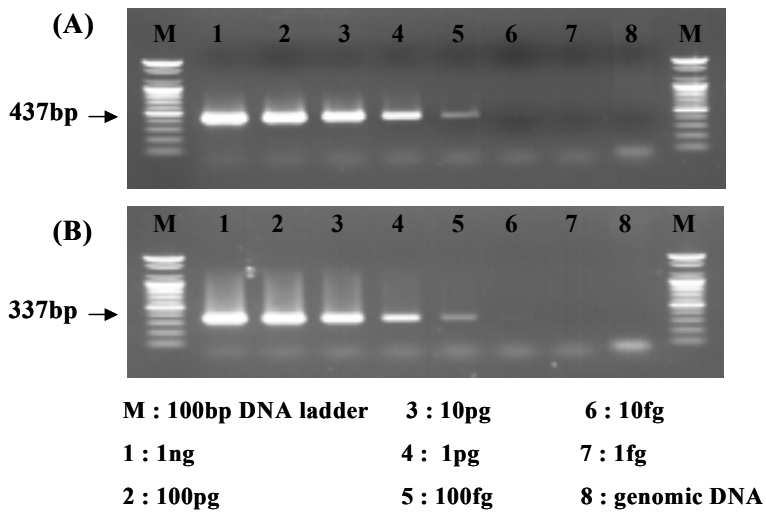


Figure 30. Dilution test for detection of retroviral vector DNA (pLCGRN). (A) hGH PCR products amplified by GH-1/2. (B) hGH sequence can reconfirm by GH-3/4.

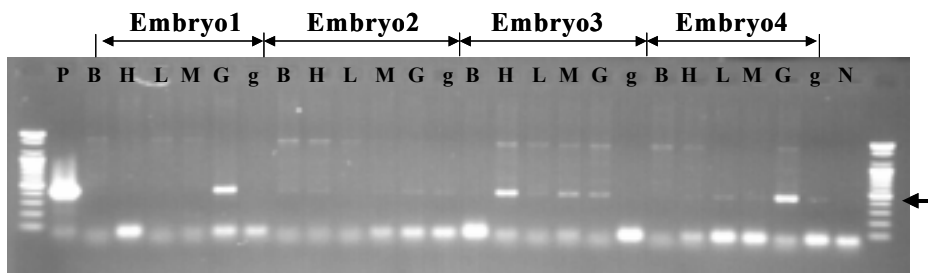


Figure 31. PCR analysis of 6-day-old embryos for the detection of hGH sequence (P; positive control, B ; blood, H ; heart, M ; muscle, L ; liver, G ; gizzard, g ; gonad, N ; negative control). Plasmid DNA (pLCGRN) was used for the positive control (lane P).

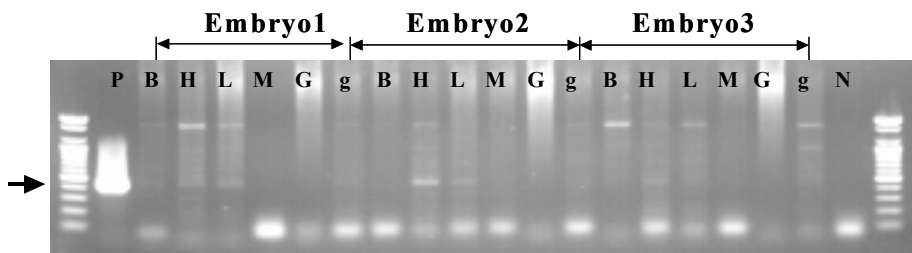


Figure 32. PCR analysis of 12-day-old embryos for the detection of hGH sequence (P ; positive control, B ; blood, H ; heart, M ; muscle, L ; liver, G ; gizzard, g ; gonad, N ; negative control). Plasmid DNA (pLCGRN) was used for the positive control (lane P).

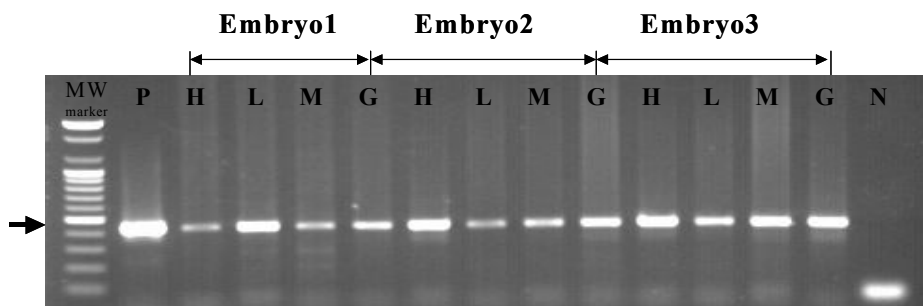


Figure 33. PCR analysis of hatched individuals for the detection of hGH sequence using primer GH-1 and GH-2 (P ; positive control, H ; heart, L ; liver M ; muscle, G ; gonad, N ; negative). Plasmid DNA (pLCGRN) was used for the positive control (lane P).

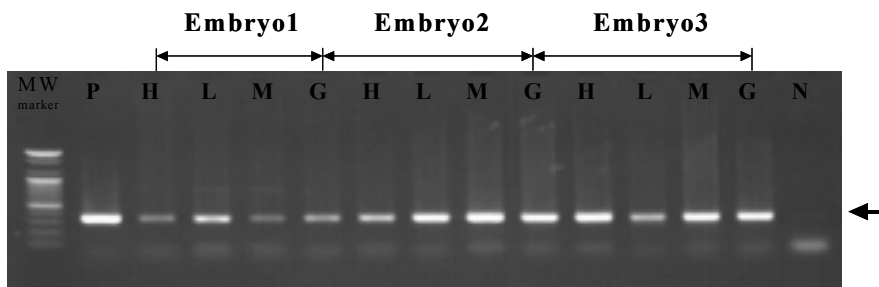


Figure 34. PCR analysis of G_0 stocks for the detection of hGH sequence using primer GH-3 and GH-4 (P ; positive control, H ; heart, L ; lung, M ; muscle, G ; gonad, N; negative control). Plasmid DNA (pLCGRN) was used for the positive control (lane P).

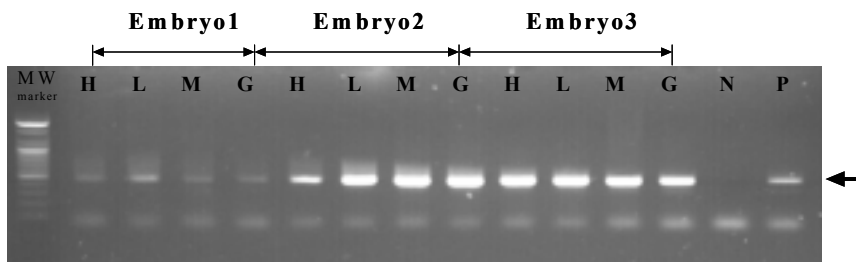


Figure 35. PCR analysis of G_0 stocks for the detection of neomycin sequence (P ; positive control, H ; heart, L ; lung, M ; muscle, G ; gonad, N; negative control). Plasmid DNA (pLCGRN) was used for the positive control (lane P).

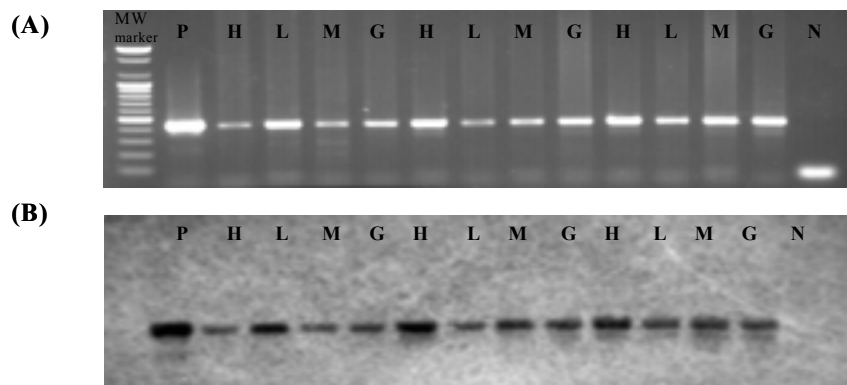


Figure 36. Southern hybridization analysis using PCR products.
 (A) PCR analysis of G_0 stocks for the detection of hGH sequence.
 (B) Southern hybridization analysis.

Table 12. PCR and Southern hybridization analysis of 6, 12-day-old and at hatched individuals infected with pLCGRN retroviral vector.

Day of incubation	No. of individuals undertaken PCR analysis	No. (%) of transgenic individuals
6-day-old	7	7 (100%)
12-day-old	7	4 (57.1%)
hatched	15	8 (53.3%)
Total	29	19 (65.5%)

Table 13. The hatchability and number of progeny-tested stocks after sexual maturation, which produced by transferring the concentrated (500x) hGH retrovirus into blastodermal layer or blood vessel.

Injected site	Injected no.	Hatched no. (%)	No. of progeny-tested (%)
Blastoderm	113	6 (5.3%)	2 (1.8%)
Blood vessel	123	38 (30.9%)	29 (23.6%)
Total	236	44 (18.6%)	31 (13.1%)

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 연도별 연구 목표

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1998-1999)	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 준 SPF 계사 설치 ▷ 원시생식세포 장기 배양 기법 및 EG cell 체계 확립 ▷ 원시생식세포의 초기 성관별 기법 확립 ▷ 생식세포주내로 유전자 전이 및 발현 검증 ▷ 벡터 개발 ▷ EG cell의 <i>in vivo</i> 주입 기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 준 SPF 계사 설치(대학측의 시설 개선 승인 공문 사본 및 지방서 첨부) - 배양액에 따른 원시생식세포 배양 - 기저 세포에 따른 원시생식세포 배양 - 성장 인자에 따른 원시생식세포 배양 - W 염색체 특이적 PCR 프라이머 확보 - whole-blood direct PCR 조건 확립 - 초기 배자 혈액의 PCR 기법 의한 성관별 기법 확립 - 생식세포주내로 유전자 전이 조건 확립 (리포솜, electroporation) - 생식세포주내의 유전자 발현 검증 (표지 유전자) - 닭 성장 호르몬 (cGH) 및 수용체 (receptor) 유전자 확보 - 성장 호르몬 분비 호르몬 (GHRH) 유전자 확보 - Insulin-like growth hormone-1(IGF-1) 유전자 확보 - 유용유전자 발현 promoter 확보 : β-actin, CMV, metallothionein 등 - 유용 벡터 재조합 - EG cell의 혈관내 주입 - Blastodermal cell내에 주입
2차년도 (1999-2000)	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 형질전환 개체 특수관리를 실험 계사확보 ▷ EG cell 배양 및 분화 특성 구명 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 전이 개체에 대한 특별 관리를 위한 계사 시설 - 유전자 전이 개체에 대한 안정성을 위한 체계 확립 - 원시생식세포의 기저 세포에 따른 계대 배양 조건 확립 - EG cell의 <i>in vitro</i> 검증 (PAS 염색, 항원검색, 분화양상 검증) - EG cell의 <i>in ovo</i> 검증 (배자내 주입 및 분화 양상 검증)

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
2차년도 (1999-2000) cont'd	<ul style="list-style-type: none"> ▷ EG cell의 <i>in vivo</i> 주입에 의한 특성 분석 ▷ 벡터의 <i>in vitro</i> 및 <i>in ovo</i> 발현 검증 ▷ EG cell내로의 외래 유전자 전이 및 주입 	<ul style="list-style-type: none"> - EG cell의 생식세포로의 분화 검증 - 세포주(HeLa cell line, STO cell line)에서 <i>in vitro</i> 발현 검증 - 벡터의 배자내 주입에 의한 <i>in ovo</i> 발현 검증 (순수 DNA 주입에 의한 방법, 리포솜 전이에 의한 방법) - 벡터가 주입된 배자의 발달 단계에 따른 발현 양상 검증 - EG cell내로의 외래 유전자 전이 (리포솜, electroporation) - EG cell에서의 외래 유전자 발현 양상 검증
3차년도 (2000-2001)	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 청정계사 시설 보완 및 소각로, 분뇨 처리 시설 보충 ▷ 벡터의 <i>in vivo</i> 발현 검증 ▷ EG에 의한 생식선 카이메라 생산 ▷ 형질전환 닭의 유전자 발현 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 청정계사 시설 보완 - 동물 폐사체 처리용 소각로 및 분뇨 처리 시설 설치 - 벡터의 성계에 대한 체내 직접 주입(<i>direct in vivo gene transfer</i>) 조건 확립 - <i>in vitro</i> 배양에서의 외래 유전자 발현 양상 검증 - 주입된 벡터의 체내 발현 양상 검증 - EG cell 주입에 의한 생식선 카이메라 생산 및 후대 검증 - 유전자를 전이한 EG cell 주입에 의한 생식선 카이메라 생산 - 후대검정에 의해 생산된 개체에 대한 유전자발현 분석 - 형질전환된 닭의 외래 유전자의 안정적 삽입 분석
4차년도 (2001-2002)	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 성장 촉진 유전자 전이 닭 검증 및 증폭 ▷ 성장촉진 유전자 전이 닭 계통 조성 ▷ 형질전환 닭에서 전이 유전자 발현 양상 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자가 전이된 닭의 표현형 및 능력 검증 - 유전자 전이 닭의 대량 증폭 및 계군 조성 - 동형접합체(homozygous) 형질전환 유전자를 갖는 개체 확보 - 형질전환 계군의 능력 검증 - 형질전환 계군의 계통 조성 - 형질전환 닭에서 전이 유전자 발현 양상 분석

2. 평가 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착안 사항	척도(점수)	달성도(%)
1차년도 (1998-1999)	<ul style="list-style-type: none"> ▷원시생식세포 장기배양 기법 및 EG cell 체계 확립 ▷원시생식세포의 초기 성판별 기법 확립 ▷성장촉진 유전자 발현 벡터 개발 ▷원시생식세포내로 유전자 전이 및 발현 검증 ▷EG cell의 <i>in vivo</i> 주입 기법 확립 ▷SPF에 준하는 청정 계사 설비 설치 	40 10 15 15 10 10	100 100 100 100 100 100
2차년도 (1999-2000)	<ul style="list-style-type: none"> ▷형질전환 개체 특수관리를 실험 계사확보 ▷EG cell 검정 및 분화 특성 구명 ▷EG cell의 <i>in vivo</i> 주입에 의한 특성 분석 ▷벡터의 <i>in vitro</i> 및 <i>in ovo</i> 발현 검증 ▷EG cell내로의 유전자 전이 및 주입 	20 20 20 20 20	100 100 100 100 100
3차년도 (2000-2001)	<ul style="list-style-type: none"> ▷청정계사 시설 보완 및 소각로, 분뇨 처리 시설 보충 ▷벡터의 <i>in ovo</i> 발현 검증 ▷EG cell에 의한 생식선 카이메라 생산 ▷형질전환 닭의 유전자 발현 분석 	10 30 30 30	100 100 100 100
4차년도 (2001-2002)	<ul style="list-style-type: none"> ▷성장 촉진 유전자 전이 닭 검증 및 증폭 ▷성장 촉진 유전자 전이 닭 계통 조성 ▷형질전환 닭에서의 전이유전자 발현양상분석 	40 40 20	100 80 80
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▷원시생식세포의 장기 배양 및 EG cell 체계 확립 ▷성장 촉진 유전자 전이 닭 계통 조성 	50 50	100 80

본 연구에서는 닭의 원시생식기 유래 원시생식세포의 장기 체외 배양 조건 확립하여 조류에서의 배아줄기세포인 생식세포주 (embryonic germ cells; EG cells) 를 획득하였다. 뿐만 아니라 이를 이용한 다음 세대로의 전이를 검증함으로써 무한한 가능성을 입증하였다. 또한 원시생식세포 및 생식세포주내로의 외래 유전자 전이 및 G418 neomycin을 이용한 선발 조건을 확립하여 형질전환 개체 생산을 위한 조건을 확립하였다. 본 연구에서는 형질전환 개체 생산을 위한 가장 확실한 판트로픽 레트로 바이러스를 이용한 형질전환 가금 생산 기법을 동시에 확립함으로써 기초 과학 및 응용 학문에서의 다양한 연구에 응용할 수 있는 기반을 확립하였다. 특정 가금류는 한 세대가 매우 짧고, 많은 자손을 얻을 수 있는 장점 그리고 배자의 체외 발달로 인한 인위적 조작의 용이함에도 불구하고 아직까지 실험 동물을 위한 계통 조성도 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서 확립된 기술을 바탕으로 하여 다양한 가금에 적용한다면 첨단 농업 및 축산으로의 발전을 이룰 수도 있을 것이다. 형질전환 닭 생산 체계 확립은 성장 촉진 유전자에 의한 성장 촉진으로 사료비 감소와 빠른 출하 시기 등에 의한 생산비 절감 효과나 질병 저항성 유전자 전이에 의한 질병에 강한 품종 개발 및 생체 반응기 (bioreactor)를 이용한 계란 내의 유용 생의학 물질의 생산으로 농업을 고부가가치의 첨단 산업화로 꾀할 수 있을 것이다. 앞으로 형질전환 닭의 생산 및 산업화에 따른 과급 효과는 경제적·산업적으로 매우 클 것이며, 축산업의 경쟁력 강화뿐만 아니라 국제화, 첨단화를 이룰 것으로 전망된다. 즉, 우수한 능력을 가진 새로운 품종 개발은 생산비 절감과 비싼 외국 품종의 수입에 대한 외화 낭비를 줄일 수 있을 것으로 전망된다. 이러한 원시생식세포 배양 기법 확립과 효율적 생식선 카이메라 생산에 의한 형질전환 닭 생산은 다양화되고 있는 소비자의 욕구 충족을 위한 다양한 품질의 닭 생산 및 기능성 닭 생산도 가능해질 수 있을 것이다. 또한 본 연구는 원시생식세포 배양 기술 확립으로 가금의 기초 생리 기작, 특히 성세포의 분화 및 분열을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 배양 기술을 이용하여 유전자 표적을 수행할 수 있는 기초 자료를 확립할 수 있는 계기가 될 수 있기 때문에 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

현재 미국과 유럽에서 형질전환 가금 생산을 위한 많은 투자와 활발한 연구가 진행 중에 있다. 그러나 아직까지 상업화를 위한 형질전환 축군 조성 및 상품화에 대한 보고는 없는 상황이다 (제 6 장 참조). 따라서, 본 연구에 있어서 추가적인 실험이 계속해서 진행된다면, 아직까지 어느 누구도 선점하지 못한 형질전환 가금 생산 기술을 독점할 수 있을 것으로 사료된다. 현재 선진국을 중심으로 하여 형질전환 가금 생산을 위한 막대한 투자와 회사 설립을 하는 이유는, 만약 이를 이용한 상업화 및 상품화에 성공하였을 경우 파급 효과는 엄청날 것으로 예측되기 때문이다. 따라서 본 연구를 통하여 축적된 기술과 결과물도 민간 기업 및 공공 연구 기관에 기술 이전 및 지속적인 연구가 진행된다면 보다 빠른 시일내 상업화를 할 수 있을 것으로 사료된다. 즉, 형질전환 닭 생산 체계 확립은 성장 촉진 유전자에 의한 성장 촉진으로 사료비 감소와 빠른 출하 시기 등에 의한 생산비 절감 효과나 질병 저항성 유전자 전이에 의한 질병에 강한 품종 개발 및 생체 반응기 (bioreactor)를 이용한 계란 내의 유용 생의학 물질의 생산으로 농업을 고부가가치의 첨단 산업화로 꺾할 수 있을 것이다.

또한 본 연구를 통한 결과는 상업화뿐만 아니라 학술적 의미도 크다고 할 수 있다. 즉, 본 연구를 통하여 확립된 닭 원시생식세포 분리 및 장기 배양 기법은 다양한 조류에 응용될 수 있어 성세포의 분화 및 분열 기작과 유전자 발현 양성 분석 등에 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 다양한 조류의 원시생식세포의 장기 배양 기법을 확립함으로써 멸종 위기 조류의 복원과 증폭에도 활용될 수 있을 것이다. 본 연구는 원시생식세포 배양 기술 확립으로 가금의 기초 생리 기작, 특히 성세포의 분화 및 분열을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 배양 기술을 이용하여 유전자 표적을 수행할 수 있는 기초 자료를 확립할 수 있는 계기가 될 수 있기 때문에 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 미국 AviGenics社외 몇 회사에서 retrovirus를 이용한 형질전환 닭 생산 보고.
- 현재 미국내 형질전환 가금 생산을 위한 10여개 회사 설립 및 연구 진행 중.

Company	Main approach to transgenic chickens
Advanced Cell Technology	avian embryonic germ cells
AviGenics	retrovirus
BioAgri	sperm-mediated gene transfer
GeneWorks	retrovirus
Origen Therapeutics	avian embryonic stem cells
TranXenoGen	direct egg transfection
Viragen	confidential
Vivalis	avian embryonic stem cells

- 현재까지 선진국에서도 형질전환 가금 생산을 위한 많은 투자 및 회사가 설립되었으나 상업화를 위한 형질전환 축군이나 상품화된 보고는 아직 없음.

제 7 장 참고 문헌

- Allioli N, Thomas J, Chebloune Y, Nigon V, Verdier G, Legras C. 1994. Use of retroviral vectors to introduce and express the β -galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev Biol* 165:30-37.
- Ando Y, Fujimoto T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migration to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25:345-352.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669-675.
- Chang I, Jeong DK, Hong YH, Park TS, Moon YK, Ohno T, Han JY. 1997. Production of germline chimeric chicken by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int* 21:495-499.
- Chang I, Tajima A, Chikamune T, Ohno T. 1995a. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol Int* 19:143-149.
- Chang I, Yoshiki A, Kusakabe M, Tajima A, Chikamune T, Naito M, Ohno T. 1995b. Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int* 19:569-676.
- Cherny RA, Stokes TM, Merei J, Lom L, Brandon MR, Williams RL. 1994. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 6:569-575.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45.
- Doetschman TC, Williams P, Maeda N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 127:224-227.
- Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ. 1991. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352:809-811.
- Donovan PJ. 1994. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development.

- Curr Top Dev Biol 29:189-225.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292:154-156.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look to the first stage of the development of the chick. I. General Morphology. Dev Biol 49:321-337.
- First NL, Sims MM, Park SP, Kent-First MJ. 1994. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. Reprod Fertil Dev 6:553-562.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci 108:3181-3188.
- Giles JR, Yang X, Mark W, Foote RH. 1993. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocyst or morulae. Mol Reprod Dev 36:130-138.
- Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature 352:807-809.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49-92.
- Han JY, Seo DS, Hong YH, Shoffner RN, Guise KS. 1994. Expression of transfected primordial germ cells in the chicken gonad and germline chimeric chicken. Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 20:108-111.
- Han JY, Shin YS, Shoffner RN, Guise KS. 1993. Stable Transformation of cultured chicken cells. Asian-Australasian J Ani. Sc. 6(4):581-589.
- Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 147:258-267.
- Jeong DK, Park TS, Kim DK, Song KD, Hong YH, Han JY. 1999. Production of germline chimeric chickens using primordial germ cells from germinal crescent and blood. Kor J Anim Sci 41:621-628.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S. 1994. Cytokine signal transduction. Cell 76:253-262.
- Koshimizu U, Taga T, Watanabe M, Saito M, Shirayoshi Y, Kishimoto T, Nakatsuji N. 1996. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells.

Development 122:1235-1242.

- Labosky PA, Barlow DP, Hogan BLM. 1994. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: Transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell line. *Development* 120:3197-3204.
- Love J, Gribinn C, Mather C, Sang H. 1994. *Bio/Technology* 12:60-63.
- Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. 1995. Production of interferon- γ by chicken T cells. *J. Interferon and Cytokine Res.* 15:933-938.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 78:7634-7638.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S-I, Williams D, Zsebo K, Hogan BLM. 1991. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:750-752.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan, BL. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847
- Meyer DB. 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev Biol* 10:154-190.
- Muller M, Winnacker E, Brem G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: New members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J Interferon Res.* 12:119-129.
- Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Kagami H, Sakurai M, Kuwana T. 1999. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J Reprod Fertil* 117:291-298.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 39:153-161.
- Naito M, Nirasawa K, Oishi T. 1995. An in vitro culture method for chick embryos obtained from the anterior portion of the magnum of oviduct. *British poultr. Sci.* 36: 161-164.
- Nieuwkoop PD, Sutasurya LA. 1979. The migration of the primordial germ cells. In *Primordial Germ Cells in the Chordates*. London: Cambridge University Press. pp. 113-127.

- Ono T, Machida Y. 1000. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comp Biochem Phys A* 122:255-259.
- Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.
- Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Transgenic mice. *Cell* 41:343-345.
- Park TS, Han JY 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 56:475-482.
- Pavlovic J, Staeheli P. 1991. The antiviral potential of Mx proteins. *J Interferon Res.* 11: 215-219.
- Perry MM. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331:70-72.
- Piedrahita JA, Moore K, Lee C, Oetama B, Weaks R, Ramsoondar J, Thomson J, Vasquez J. 1997. Advances in the generation of transgenic pigs via embryo-derived and primordial germ cell-derived cells. *J Reprod Fertil (suppl)* 52:245-254.
- Piedrahita JA, Moore K, Oetama B, Lee C, Scales N, Ramsoondar J, Bazer FW, Ott T. 1998. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod* 58:1321-1329.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359:550-551.
- Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J. 1991. Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An *in vitro* developmental study. *J Biol Chem* 266:22419-22426.
- Sang H. 1994. Transgenic chickens—methods and potential applications. *Trends Biotechnol* 12:415-420.
- Schultz UJ, Kock, H, Schultz J, Staeheli P. 1995. Recombinant duck interferon; A new reagent for studying the model of interferon action against hepatitis B virus. *Virology* 212:641-643.
- Sekellick M, Ferrandino A, Hopkins D, Marcus P. 1994. Chicken interferon gene : cloning, expression, and analysis. *J Interferon Res.* 14:71-79.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 95:13726-13731
- Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen L, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. 1997.

- Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 57:1089-1095.
- Solter D, Knowles BB. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci* 75:5565-5569.
- Surfsh M, Karaca K, Foster D, Sharma J. 1995. Molecular and functional characterization of turkey interferon. *J. of Virology* 69(12):8159-8163.
- Swartz WJ. 1982. Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo. *Anat Rec* 202:379-385.
- Swift CH. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am J Anat* 15:483-516.
- Tagami T, Matsubara Y, Hanada H, Naito M. 1997. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Develop Growth Differ* 39:267-271.
- Tajima A, Naito M, Yahuda Y, Kuwana T. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J Zool* 280:265-267.
- Tanaka K, Wada T, Koga O, Nishio Y, Hertelendy F. 1994. Chick production by in vitro fertilization of the fowl ovum. *J Reprod. and Fertil.* 100:447-449.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147
- Ukeshima A, Yoshinaga K, Fujimoto T. 1991. Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J Electron Microsc* 40:124-128.
- Vick L, Li Y, Simkiss K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc. R. Soc. Lond. B* 251:179-182.
- Wentworth BC, Tsai H, Hallett JH, Gonzales DS, Rajcic-spasojevic G. 1989. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poultry Sci* 68:999-1010.
- Wheeler MB. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 6:563-568.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. 1984. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152:212-219.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. 1992. A method to obtain avian germ-line

chimeras using isolated primordial germ cells. J Reprod Fertil 96:521-528.

Yoshida K, Chamber I, Nichols J, Smith A, Saito M, Yasukawa K, Shoyab M, Taga T, Kishimoto T. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signaling pathway. Mech Develop 45:163-171.

서동삼, 홍영호, 최강덕, 양무희,한재용. 1995. 배반엽성세포를 이용한 카이메라 닭 (화이트레 그혼↔오골계) 생산. 한국축산학회지 37(1):27-32.

이황, 김선옥, 이상호. 1994. Isolation and culture of mouse primordial germ cells *in vitro*. 축산분야 종합학술대회. pp. 133.

전익수, 한수연, 김종대, 정일정, 이찬동, 최광수. 1994. 대리난각을 이용한 닭의 3일째 수정란의 발생과 부화. 축산분야 종합학술대회. pp. 125.