

인공 체외배양 및 대리난각 배양을 이용한 형질전환 닭 생산

전익수 · 윤두학 · 노환국 · 홍영호 · 최철환 · 정일정 · 한재용*
축산기술연구소, *서울대학교 농업생명과학대학

서론

1세포기 닭 수정란의 완전 인공 체외배양에 대한 연구는 Perry(1988)에 의해 최초로 체계화된 후 발생을 및 부화율 개선을 위한 연구가 진행되어 왔으며(Naito 등, 1990; Perry와 Mather, 1991), 메추리, 오리등 다양한 가금류 수정란의 체외배양에 응용 되어지고있다(Ono 등, 1994; Li와 Qi, 1996). 또한 인공 체외배양에 의한 부화에 성공함으로써 가금 수정란을 이용한 생명공학 적 기법 적용이 1세포기 수정란(zygote), 배반엽기 수정란, 초기배자등 여러 발생단계에서 효과적으로 수행 될 수 있는 계기가 되었다. 특히, 1세포기 닭 수정란의 완전 인공 체외배양에 의한 병아리 발생이 성공함으로써 1세포기 수정란 상태에서 외래 유전자를 미세주입하여 형질전환 닭을 생산 할 수 있게 한 필연적인 동기가 되었다. 본 발표에서는 한국 재래닭의 1세포기 수정란 단계에서부터 병아리 발생까지 완전 인공 체외배양에 의한 결과와 한국 재래닭의 1세포기 수정란(zygote)에 외래 유전자를 미세주입하여 형질전환 닭을 생산 하고자 시도한 결과에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 기본 배양법은 Perry(1988)가 제시한 1세포기 닭 수정란의 체외배양법을 다소 수정하여 41.5°C, CO₂ 5%, 습도 100%의 배양기에서 24시간 배양 후, 37.6°C, 습도 60~70%의 배양기에 11분마다 90° 씩 전란 하면서 3일간 배양하는 방법을 사용하였고, 그후 동일한 온습도에서 45분마다 30° 씩 전란 하면서 18일간 배양 한 후, 부화 될 때까지는 전란을 중지하는 방법을 사용하였다. 1세포기 수정란에 외래유전자를 미세주입하기 위하여 미세소자봉을 외경 60 μ m, 각도 30° 로 제작하여 사용하였으며, 사용한 유전자는 pCMV β vector의 β -galactosidase gene 발현 부위를 절단한 후 분리 회수하여 사용하였다.

결과 및 결론

한국 재래닭의 1세포기 수정란을 체란하여 체외배양과 대리난각 배양한 결과 배양 4일차에 39.3%, 11일차에 24.6%, 19일차에 19.4%의 생존율을 얻었으며 12.8%의 부화율을 획득하였다. 또한 그와 동시에 형질전환 닭을 생산하고자 211개의 1세포기 닭 수정란에 외래 유전자를 미세 주입한 결과 27수가 부화되었다. 부화된 27수의 용모요막(chorioallantoic membrane; CAM)을 추출하여 외래유전자 삽입 및 통합 여부를 PCR에 의해 검정해본 결과 현재까지 2 마리가 검출되었다. 본 연구에서 얻어진 결과로서 1세포기 닭 수정란의 체외배양과 대리난각 배양에 의한 부화는 성공적이었으며, 이러한 배양체계는 가금 수정란을 이용한 생명공학적 기법 적용에 장애가 되어왔던 기본 배양법의 문제점을 효과적으로 해결하여 다양한 발생학적 응용이 가능하게 되었다. 또한 미세주입시 미세소자봉이 수정란에 가하게되는 물리적인 충격을 다소 완화시킬 수 있다면, 1세포기 수정란에 외래 유전자를 직접 주입하여 형질전환 닭을 생산하기 위한 기술이 진일보 할 수 있는 계기가 될 것이라 사료된다.

인용문헌

- Perry, M. M. 1988. Nature, 331: 70-72.
Naito, M. et al. 1990. J. Exp. Zool., 254 : 322-326.
Perry, M. M. and Mather C. 1991. Avian Incubation, 91-106.
Ono, T. et al. 1994. Dev. Biol., 161 : 126-130.
Li, Z. D. and Qi, S. Z. 1996. AJAS. 9(2): 195-197.