

GFP(Green Fluorescent Protein)가 발현되는 형질전환 닭의 생산

구본철¹, 권모선², 전익수³, 김태완²

¹충북대학교 축산학과, ²대구가톨릭대학교 대학 생리학교실, ³축산기술연구소 응용생명공학과

Abstract

본 연구에서는 VSV-G(vesicular stomatitis virus G glycoprotein)로 포장된 MoMLV(Moloney murine leukemia virus) retrovirus vector system을 이용하여 GFP가 발현되는 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. GFP 유전자를 retroviral vector 내의 RSV(Rous sarcoma virus) promoter의 조절 하에 도입한 후, GP293 세포주에서 virus 형태로 생산하였으며, 이 virus를 초원심분리로 고농축하여 stage X 계란의 배반엽 층에 주입하여 GFP가 발현되는 형질전환 닭을 생산하였다. 생산된 닭에서의 GFP의 발현은 epifluorescence stereomicroscope를 이용하여 확인하였다. 이 방법은 기존의 여러 형질전환 가금 방법에 비하여 기술적인 용이성과 경제성을 가지므로(Muramatsu, Park and Okumura 1998), 매우 효율적이고 주목할 만한 형질전환 가금 생산 방법으로 사료된다.

(Key words : GFP, 형질전환 닭, retrovirus vector, VSV-G)

서 론

동물을 bioreactor로 사용하고자 하는 시도는 현재까지 대부분 포유동물에서 행하여지고 있다. 그러나 닭을 비롯한 가금의 경우, 일반 포유류 가축에 비해 다산성, 짧은 세대간격 등과 같은 장점에도 불구하고 이에 대한 연구결과가 거의 없는 실정이다. 주된 이유는 배반엽이 난각과 난황으로 둘러싸여 있고 또한 그 배반엽이 산란 당시 이미 60,000개 이상의 세포로 구성되어 있기 때문에 유전자 전이가 어렵기 때문이다(Eyal-Giladi, Ginsburg and Fabarov, 1981).

이러한 문제점을 해결하기 위하여 virus의 감염성 손실 없이 고농도로 농축이 가능한 VSV-G로 포장된 MoMLV retrovirus vector(Burns et al., 1993)를 이용하여 GFP가 발현되는 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

RSV promoter의 downstream에 GFP 유전자를 삽입하여 재조합한 pLNRG는 PT67 virus 생산 세포에 transfection하여 virus를 생산한 후 이virus를 GP293 세포에 감염시켜서 GP293-LNRG 세포주를 구축하였으며, 이 세포에 calcium phosphate 방법으로 pHCMV-G를 일시적으로 transfection하여 pantropic한 virus를 수확하였다. 생산된 virus는 초원심분리로 1,000배 농축한 후 10 µg/ml 농도의 polybrene를 첨가하였으며 이를 stage X 계란의 배반엽 층에 주사하여 형질전환 닭을 생산하였다. 생산된 닭에서 유전자의 발현여부는 GFP 전용 filter(460~490 nm excitation, 510~550 nm emission)가 장착된 fluorescence stereomicroscope(Olympus szx12)를 통하여 확인하였다.

결 과

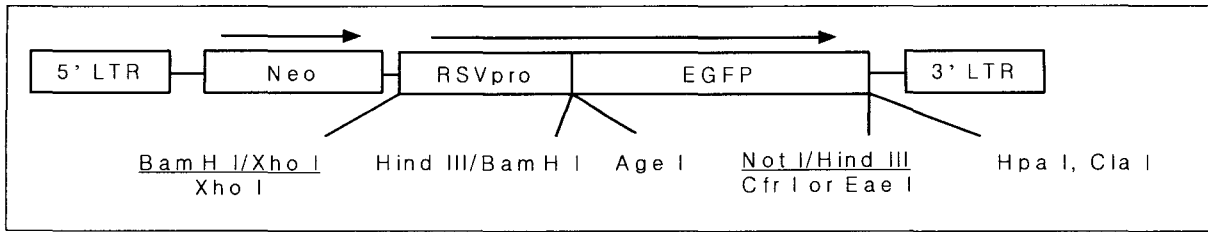


Fig. 1. Structure of retrovirus vector.

* LTR : long terminal repeat, Neo : G418 resistance gene, RSVpro : Rous sarcoma virus promoter, EGFP : enhanced green fluorescent protein gene.

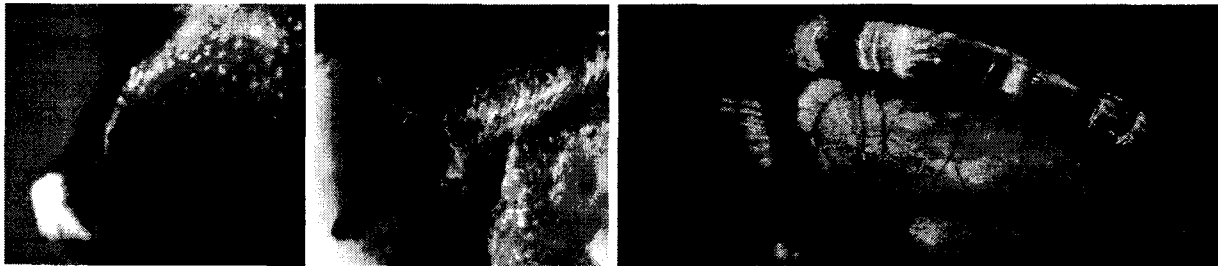


Fig. 2. Expression of GFP gene in chicken embryos and chick.

적 요

형질전환 가금의 생산에서 retrovirus vector를 이용하는 방법은 다양한 종류의 표적세포에 대하여 retrovirus 고유의 감염성에 의한 외래 유전자의 전이가 용이하고, 전이된 유전자가 진정염색질 영역 내로 선택적으로 도입될 수 있으며 유전적으로 안정성을 나타내므로 매우 효과적인 방법이다. 그러나 가금에서는 초기 배 발달에 의한 급격한 세포의 수적 증가로 인해 고감염성 virus의 획득이 요구되므로, 본 연구에서는 virus의 농축에 있어 보다 안정적이고 숙주 범위에 있어서 pantropic한 VSV-G에 기반을 둔 retrovirus vector system을 확립하였다. 이 system은 기존의 형질전환 닭의 생산방법에 비해 외래 유전자의 전이에 있어서 매우 효과적인 것으로 확인되었으며, 또한 여러 유용한 생리활성물질을 분비하는 형질전환 동물의 생산에 있어서 상당한 기여를 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Muramatsu T, HM Park, and J Okumura. 1998. Current status and perspectives on in vivo gene transfer to avian species. Paper presented at proceedings 6th Asian Pacific Poultry Congress, Nagano.
- Eyal-Giladi H, M Ginsburg and A Fabarov. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morph.* 65:139-147.
- Burns JC, T Friedmann, W Driever, M Burrascano, and JK Yee. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037.