

Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein Envelope으로 포장된 Defective Retroviral Vector를 이용한 닭의 배로의 유전자 전이

권모선¹ · 임은정¹ · 허영태² · 이훈택² · 이영만 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Gene Transfer into Chicken Embryos using Defective Retroviral Vectors Packaged with Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein Envelopes

Kwon, M. S.¹, E. J. Im¹, Y. T. Heo.², H. T. Lee²,
Y. M. Lee and T. O. Kim[†]

Dept. of Physiology, School of Medicine Catholic Univ. of Daegu

ABSTRACT

Compared to other gene transfer system, the advantages of retrovirus-mediated gene transfer are technical ease, efficient expression and genetic stability. Despite the high potency of the retrovirus vector system in gene transfer, one of the drawbacks is a difficulty in concentration of virus stock. To overcome this problem, we tested a new retrovirus vector system producing the progeny retrovirus particles encapsidated with VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein). The infectivity of this virus was not sacrificed by ultracentrifugal concentration and the host cell range extended from all mammalian to fish embryos. Virus titer after 1,000 × concentration was more than 10⁸ CFU/ml on most of the target cell lines. We applied this pantropic viruses in transgenic chicken production by injecting the concentrated (100×) stock into subgerminal cavity of stage X chicken embryos. The survival rate of chicken embryos after injection was about 20% and gene integration rate in surviving embryos was scored almost 100%. Analyses of RT-PCR and fluorescence microscopy, however, showed no evidence of the transgene expression.

(Key words : Retrovirus vector, VSV G, Concentration of virus stock, Embryo injection)

I. 서 론

최근까지 형질전환동물의 생산에 관한 연구의 대부분은 주로 소, 돼지, 양, 토끼 그리고 염소 등의 포유류를 대상으로 이루어졌으며, 시간과 비용의 방대한 투자에도 불구하고 경제적인 측면에서

성공적인 형질전환 가축의 생산에 대한 보고는 미비한 실정이다. 이 같은 현상은 대부분 포유류들의 긴 세대 간격, 천문학적 비용과 많은 시간, 그리고 복잡한 생리적 형태적 특징에 기인한다. 한편 가금류들은 포유류에 비해 첫째, 성숙기간과 세대간격이 짧으며, 둘째, 포유류에 비해 번식능력이 대단히 높기 때문에 형질전환된 가금의 계통성립

[†] Corresponding author : E-mail : takim@cuth.cataegu.ac.kr

¹ 계명대학교 생물학과 (Dept. of Biology, Keimyung Univ.)

² 건국대학교 축산대학 (College of Animal Husbandry, Konkuk Univ.)

이 용이하고, 셋째, 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하다는 장점을 가지고 있다(Naito 등, 1994; Vick 등, 1993; Han 등, 1994). 그러나 가금류의 경우, 포유류와는 달리 수정시 일어나는 일반적인 다정자침입(poly-spermy) 현상(Perry, 1987)이나, 수정 후부터 산란 직후까지의 배발생으로 인하여 stage X 시기의 배에는 배반엽에 약 60,000여 개의 pluripotent한 세포들이 존재하게 된다(Eyal-Giladi 등, 1981). 이러한 형태적, 발생적 특징으로 인해 가금류에 있어 포유류의 경우와 동일한 방법으로 외래 유전자를 도입하는 것은 매우 어렵다. 뿐만 아니라 닭의 수정된 난자는 포유류와 비교하여 크기가 크고, 파손되기 쉬워 포유류에 사용되고 있는 유전자 이식 기술의 적용이 불가능하다.

형질전환 가금의 생산에 있어서 현재 사용되고 있는 방법은 다음과 같다. 첫째, 수정란의 배반엽에 유전자를 직접 미세주입하는 것으로, 발생 중인 배의 조직이나 부화한 후의 개체에서 유전자의 발현을 확인하였으며(Sang과 Perry, 1989; Perry 등, 1991; Naito 등, 1991; Ono 등, 1994), Love 등 (1994)은 다음 세대에서 외래 유전자의 전이를 확인하였다. 둘째, 배반엽 세포를 이식하는 방법(Marzullo, 1970; Watanabe 등, 1992; Brazolot 등, 1991)이 있는데 이 방법은 동일 개체 내에서 mosaicism이 나타났으며, 중간 chimera가 생산되었다. 이 외에 sperm vector를 이용한 방법이 시도되었으며(Gavora 등, 1991; Grunebaum 등, 1991), 유정란에서 분리한 primordial germ cell (PGC)에 retrovirus를 도입하여 이 PGC를 배에 주입하는 방법(Simkiss 등, 1989; Savva 등, 1991; Shumann과 Shoffner, 1986)이 보고되어 있다. 또 다른 방법으로는 retrovirus vector를 stage X의 배반엽 층에 주입하는 방법이 있는데, Salter 등(1987)은 닭의 배에 replication-competent retroviral vector를 직접 주입하여 생식세포에서 전이를 보고하였고, Bosselman 등(1989)은 replication-defective retroviral vector를 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다. 이 방법은 유전자의 전이에 있어서 retrovirus 고유의 감염성을 이용하므로 기술적으로 가장 용이하다는

장점이 있지만 고농도의 virus stock을 수확하는 데 있어서 감염성 저하 등의 문제점이 지적되고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 VSV-G glycoprotein을 envelope으로 하는 retrovirus vector system (Kim 등, 2001)을 사용하였다. 이 system에 의해 생산되는 virus는 초원심분리로 농축시켜서 감염도를 1,000 배 이상 증가시킬 수 있으며 또한 pantropic이기 때문에 어류를 포함하여 거의 모든 동물세포를 감염시킬 수 있는 장점을 가지고 있다(Lin 등, 1994).

본 연구에서는 이 pantropic한 retrovirus vector system을 이용하여 생산한 고농도의 virus stock을 stage X인 계란의 배반엽 층에 미세주입하여 외래 유전자가 배의 genome 내로 전이되도록 시도하였으며, 발생한 배에서 유전자의 전이와 발현을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양(Cell culture)

본 실험에서 사용한 모든 세포주, 즉 293m GPHy (Kim 등, 2001), PA317 (Miller와 Buttimore, 1986), PG13 (Miller 등, 1991), NIH3T3 (mouse embryonic fibroblast, ATCC CRL 1658), EBTr (bovine embryonic trachea cell, ATCC CCL 44), HeLa (human cervix carcinoma cell, ATCC CCL 2), 그리고 primary culture한 CEF (chicken embryonic fibroblast)의 배양액으로 10%의 FBS (fetal bovine serum; GibcoBRL)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 μ g/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL) 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL 12800-017)을 사용하였다. 이 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

2. Retrovirus vector의 구축(Construction of retrovirus vector)

β -Actin promoter의 downstream에 *eGFP* gene을 도입한 pLN β eGFP retrovirus vector plasmid는 Fig. 1과 같이 구축하였다.

3. Retrovirus vector의 생산(Production of retrovirus vector)

Retrovirus vector인 pLNβeGFP를 PA317에 transient transfection하여 virus를 만든 후 이 virus가 포함된 배양액을 PG13에 감염시켰으며 5 μg/ml의 polybrene을 첨가하였다. G418 (800 μg/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하여 살아남은 PG13 colony의 pool을 배양한 후 이들 세포로부터 수확한 virus stock (Kim et al., 1993)을 본 실험실에서 구축한 293mGPHy 세포에 감염시켜 G418 (800 μg/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R (G418 resistant) 293mGPHy-LNβ eGFP 세포에 calcium phosphate 방법으로 20 μg의 pHCMV-G를 transfection하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아 주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus를 포함한 배양액을 수확하였다.

4. Virus의 농축과 표적세포의 감염(Concentration of virus and infection of target cells)

수확한 virus stock은 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용하여 원심분리를 하였다. 상등액을 완전히 제거한 후 침전물에 0.1 X Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Yee 등, 1994)이나 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축된 virus stock은 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다. Virus의 titer를 측정하기 위하여 농축 전과 후의 virus stock을 여러 종류의 표적세포에 감염시켰다. 24시간 경과 후 세포를 split하여 slide glass 상에서 24시간 배양 후 형광현미경으로 GFP의 발현을 관찰하거나 또는 3일 간격으로 G418이 첨가된 선별배양액으로 갈아주어 Neo^R colony forming unit per milliliter (CFU/ml)를 측정하였다.

5. 자가증식을 하는 virus의 생산 여부 확인 (Examination of replication-competent helper virus production)

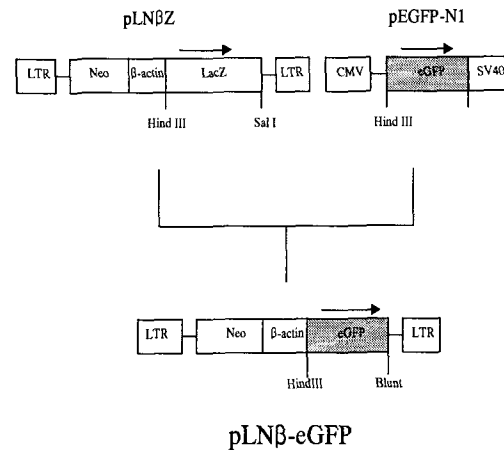


Fig. 1. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; β-actin, rat β-actin promoter; eGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene. The pLNβ eGFP was constructed by replacing the LacZ gene fragment of the pLNβZ with eGFP fragment derived from 780 bp Hind III - Not I fragment of pEGFP-N1 purchased from Clontech.

감염과 선별과정이 끝난 Neo^R 표적세포의 배양액을 0.45 μm pore-size filter를 이용하여 여과한 후 PG13 packaging cell에 재감염시켰다. 48시간 배양한 후 배양액을 수확하여 HeLa 세포에 감염시켜서 G418 (800 μg/ml)을 첨가한 선별배양액으로 2주간 배양하였다.

6. 닭의 배에 대한 감염(Chicken embryo infection)

본 실험에 사용된 유정란은 ISA brown 산란계 종으로, 경기도 오산 소재 농원에서 28주령의 균일도가 높은 산란계군을 선발하여, 이들이 산란한 종란 중, 60±3 g 무게의 것만을 구입하였다. 부화를 시작하지 않은 종란(stage X)을 측상향 위치 상태로 10시간 정치하여 배자가 계란의 적도 상단부에 위치하도록 한 후 그 부분을 드릴을 이용하여 4 mm² 크기로 절단하여 window를 만들었다. 특수가공한 microinjection pipette (SIGMA, pipette, mi-

crocapillary, 50 μ l, 100 mm length)을 이용하여 10 μ g/ml의 polybrene이 첨가된 virus stock 10 μ l를 배하층에 주입하였다. 대조군으로 사용한 DMEM/FBS나 HBSS도 동량의 polybrene을 첨가하여 주입하였다. Virus의 주입이 끝난 계란은 window를 parafilm으로 3회 감아서 밀봉한 후 측상향 위치 상태로 26°C의 부화기에서 1시간 가량 정치함으로써 온도 충격과 물리적 충격을 안정화시켰다. 37.7°C의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 2시간 주기로 전란시키면서 18일간 발생시킨 후, 19일째 부터는 계란을 37°C의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양시켰다. 배양하는 동안 10일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부를 검란기를 통하여 관찰하였다.

7. 닭의 배자섬유아세포의 일차배양(Primary culture of chicken fibroblast)

닭의 배자섬유아세포(chicken embryonic fibroblast; CEF)는 7일령 배자를 꺼내어 PBS로 충분히 수세한 후 5×Trypsin/EDTA 용액을 첨가하여 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 방치하였다. 처리된 조직을 1분 30초동안 교반하고 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 침전물을 DMEM/FBS (10%)용액과 혼합하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 계대배양으로 debris가 완전히 제거된 세포에 virus를 감염시킨 후 GFP 발현 여부를 형광현미경을 사용하여 확인하였다.

병아리의 조직을 이용한 primary culture는 장기로부터 떼어낸 조직을 4°C에서 PBS로 3회 수세한 후 해부용 칼이나 가위를 사용하여 작게 chopping 하였다. 조직이 든 tube에 5×Trypsin/EDTA 용액을 적당량 첨가하여 30분간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰으며 반응이 끝난 후 1분 30초 동안 교반하고 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 충분한 pipetting으로 세포를 조직으로부터 분리시켰다. 용액 속의 trypsin 작용을 억제하기 위하여 DMEM/FBS (10%) 용액을 첨가하였으며, 최종적으로 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전물을 DMEM/FBS (10%) 용액에 재부유하여 37°C,

5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액은 이틀에 한번씩 교환해 주었으며 계대배양한 후 자란 세포를 slideglass 상에서 배양하여 형광현미경으로 GFP 발현 유무를 확인하였다.

발생한 병아리의 조직에서 GFP 발현 유무를 확인하기 위해서 각 장기의 조직을 frozen section machine (Leica CM1850)을 이용하여 프레파라트를 제작한 후 형광현미경하에서 관찰하였다.

8. 조직에서의 DNA 분리와 PCR (DNA purification from tissue and PCR)

병아리의 날개 말단 부위에서 조직을 절취하여 액체질소가 담긴 막자사발을 이용하여 고운 분말로 파쇄한 후 QIAamp DNA mini kit를 사용하여 DNA를 분리하였다.

PCR은 조직에서 분리한 DNA를 각각 0.5 μ g씩 취하여 50 pmole의 각 primer, 50 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polymerase (Promega), 10 × Taq polymerase buffer (Promega)와 혼합한 후 94°C에서 5분간 방치 후, 94°C에서 30초(denaturation), 61°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초간(extension) 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였다. 반응에 사용한 primer의 sequence는 eGFP gene에 대해서는 + strand primer sequence로 5'gagcg-caccatctttcaaggac3'과 - strand primer sequence로 5'aactccagcaggaccatgtgatcg3'을 사용하였으며, Neo gene에 대한 primer sequence로는 + strand primer sequence로 5'attccgatctgatcaagagac3'과 - strand primer sequence로는 5'tttccaccatgatattcggca3'을 사용하였다. 반응이 끝난 후 72°C에서 5분간 방치한 후 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

9. RNA 분리와 RT-PCR (RNA isolation and RT-PCR)

RNA 분리는 Qiagen 회사의 RNA Mini Kit를 사용하였다. 조직의 경우에는 액체질소에 넣어서 파쇄하여 준비하고, 세포는 1×trypsin/EDTA를 처리하여 준비하였다. RT-PCR은 조직이나 세포에서 분리한 RNA를 3 μ g 정도 취하여 50 pmole의

primer, 0.2mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 5 U AMV Reverse Transcriptase (Promega), 5 U TflDNA Polymerase (Promega), AMV/Tfl 5×Reaction Buffer (Promega)로 만든 reaction mixture와 혼합한 후, 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48°C에서 45분간 반응한 다음 AMV Reverse Transcriptase의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94°C에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 30초, 61°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72°C에서 5분간 방치하였다. Primer는 PCR의 경우와 동일한 것을 사용하였으며, 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 다양한 표적세포에 대한 감염성 조사(Infectivity on the various target cells)

본 실험에서는 retrovirus stock의 농축에 있어서 감염성 저하 등의 문제를 해결하기 위하여, 기존의 retrovirus envelope protein gene 대신에 VSV-G gene

Table 1. Host range of LNβ eGFP vector produced by using VSV-G packaging cells

| Target cells | Titer (NeoR CFU/ml a) of 293mGPHy/VSV-G b | |
|----------------|---|-----------------------|
| | 1 × | 1000 × |
| NIH3T3 (mouse) | 3.0 × 10 ⁵ | 2.8 × 10 ⁸ |
| HeLa (human) | 7.4 × 10 ⁴ | 6.5 × 10 ⁸ |
| EBTr (bovine) | 2.9 × 10 ⁵ | 3.0 × 10 ⁸ |
| CEF (chicken) | 9.8 × 10 ⁴ | N/A ^c |

Titer of the LNβ-eGFP viruses produced from 293 mGPHy/VSV-G packaging cell lines.

^a Neo^R CFU/ml refers to G418 resistant colony forming unit per ml.

^b 293mGPHy/VSV-G refers to 293mGPHy cells expressing VSV-G gene.

^c N/A; not applicable, because Neo^R CFU/ml was not numerically measured due to technical difficulties.

을 도입하였다. 이 retrovirus는 거의 모든 종의 동물세포에 높은 감염성을 가지는 pantropic의 특성을 가지고, 또한 1,000배 이상의 농축도 가능하다. LNβeGFP (Fig.1)와 VSV-G gene이 발현되는 virus 생산세포인 293mGPHy-LNβeGFP 세포의 retrovirus stock을 초원심분리로 농축하여 여러 표적세포에 감염시켜 Neo^R CFU/ml titer를 측정하였다. 농축하기 전의 retrovirus의 titer는 7×10⁴~3×10⁵ 정도로 나타났으며 1,000배로 농축한 후의 titer는 1×10⁸~7×10⁸으로 나타났다(Table 1). Gibbon ape leukemia virus envelope protein으로 envelope가 형성된 전통적인 retrovirus를 농축한 경우 virus의 titer가 농축 배수의 약 1/20로 나타난 보고와 비교해 볼 때(Kim 등, 2001), 이 retrovirus는 대부분의 표적세포에서 농축배수와 titer의 증가 배수가 1:1의 비로 나타났으며 이러한 결과는 VSV-G로 envelope가 형성된 virus가 원심분리에 의한 농축 후에도 감염성 저하 등의 현상이 나타나지 않는 것을 보여준다.

또한 이 vector system은 실험에 사용한 모든 표적세포에서 비교적 양호하게 titer를 나타냄으로써 숙주세포의 범위가 광범위함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 최종 실험 대상인 닭의 배에서 유래된 CEF 세포를 감염시켜서 GFP의 발현을 확인한 결과 대부분의 세포에서 eGFP gene의 발현이 형광현미경에 장착된 FITC (fluorescein isothiocyanate) filter cube를 통하여 관찰되었다(Fig. 2).

2. 자가증식을 하는 virus의 생산 여부 확인 (Test of replication-competent helper virus production)

Virus를 생산하는 세포로부터 replication-competent helper virus가 생산되는지의 여부를 확인하기 위하여 retrovirus vector의 감염과 G418 선별 과정을 거친 Neo^R 표적세포로부터 수확한 배양액을 PG13 packaging cell에 감염시켰다. 48시간동안 배양 후 PG13 세포에서 수확한 배지를 여과하여 그 중 1 ml을 HeLa 세포에 감염시켰다. 2주 동안 G418이 첨가된 용액으로 선별한 결과 Neo^R colony가 전혀 나타나지 않았으며 이러한 현상은 293m

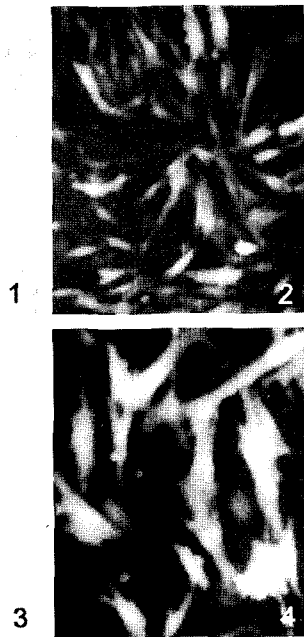


Fig. 2. Expression of the GFP gene from transgenic primary culture cells of chicken embryonic fibroblast. Cells were grown on a slideglass and examined through a fluorescence microscope ($\times 100$ (1, 2), $\times 400$ (3, 4)) under white (1, 3) or UV (2, 4) light.

GPHy 세포로부터 유래된 virus 생산 세포에서 helper virus가 전혀 생산되지 않음을 보여주는 것이다.

3. Retrovirus stock을 이용한 닭의 배의 미세주입과 유전자의 전이 여부 확인(Microinjection of chicken embryos with the retrovirus stocks and determination of gene transfer)

배의 생존율과 부화율의 증가를 위하여 주입에 의해 받는 손상을 최소화시키고자 계란을 측상향 위치 상태로 방치하여 적도 부위에 배자가 위치하도록 하였는데 이는 배자가 상단부에 위치하도록 하여 조작 거리를 짧게 확보함으로써 기실의 손상에 의한 부화율의 저하를 방지하고 정확한 virus의 주입이 가능하게 하였다.

배의 발생에 최대한 영향을 주지 않는 가장 적절한 retrovirus stock의 재부유 배지를 결정하기 위

Table 2. Efficiency of virus media in gene transfer to chicken embryos

| Medium | No. of eggs injected | No. (%) of eggs surviving |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|
| Control (no puncture) | 20 | 18 (90) |
| DMEM/FBS | 20 | 13 (65) |
| HBSS | 20 | 4 (20) |

To each freshly laid egg, 10 μ l of DMEM/FBS or HBSS virus media was injected into the subgerminal cavity, then incubated for 10 days.

하여 Yee 등(1994)이 초원심분리 후 침전된 virus를 재부유할 때 사용한 HBSS와 virus 생산 세포를 배양할 때 사용하였던 DMEM/FBS를 동일한 양으로 취하여 미세주입하였다. 이를 정상적인 수정란과 동일한 조건인 37.7°C, 상대습도 55%에서 2시간 간격으로 전란하여 10일간 배양한 후 생존율을 조사하였다. 정상적인 수정란에 비해 virus를 주입한 군이 생존율이 낮게 나타났는데, 이러한 현상은 window를 만드는 과정에서 초래되는 물리적인 충격과 난각 파편에 의한 영향, 그리고 주입시 배반엽 층에 형성되는 구멍 때문인 것으로 보인다. 배지를 주입한 군 중에서는 DMEM/FBS를 주입한 군이 HBSS의 경우보다 3배 이상의 생존율을 나타내었다(Table 2). 따라서 농축된 retrovirus stock의 재부유 배지로 DMEM/FBS를 사용하기로 하였다.

Window를 제작하는 물리적인 과정과 virus stock의 주입이 배발생에 끼치는 영향을 조사하기 위하여 실험군인 virus media를 주입한 군과 대조군인 DMEM/FBS를 주입한 군, 그리고 조작을 하지 않은 정상 수정란을 동일한 조건에서 배양하여 배양 10일, 18일, 21일에 생존율을 조사하였다. 배양 10일까지는 세 군이 큰 차이를 보이지 않았으나 18일에서는 virus를 주입한 군이 현저한 생존율 저하 현상을 보였다. 21일 배에서는 정상 수정란 군이 94%의 생존율을 보인 것과는 대조적으로 DMEM/FBS를 주입한 군이 40%, virus media를 주입한 군이 36%의 생존율을 나타내었다(Table 3). 이러한 현상은 window를 만드는 것이 계란의 부화율에 직접적인 영향을 끼치고, 또한 retrovirus의

Table 3. Survival and hatching rates of manipulated chicken embryos

| Treatment | No. of embryos | No. (%) of embryos surviving | | |
|------------------------|----------------|------------------------------|---------|---------|
| | | 10 days | 18 days | 21 days |
| Control (no injection) | 50 | 47 (94) | 47 (94) | 47 (94) |
| DMEM/FBS | 25 | 20 (80) | 14 (56) | 10 (40) |
| eGFP | 50 | 30 (60) | 20 (40) | 18 (36) |

To each freshly laid egg, 10 μ l of DMEM/FBS or pre-concentrated virus stock (eGFP) was injected into the subgerminal cavity, then incubated for 21 days. Surviving rate was detected at day 10, 18, 21 of incubation.

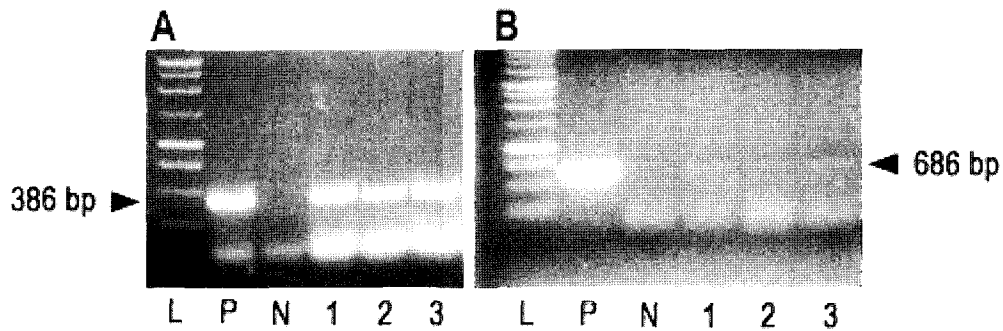


Fig. 3. PCR analyses of the eGFP (A) and Neo (B) genes in manipulated chickens. L: 100 bp ladder, P: Positive control, N: Negative control, 1 ~ 3: Samples from 3 different chickens.

주입이 배발생이나 부화에 부정적인 영향을 나타내는 것을 의미한다. 실제로 발생 중인 배에서 안구의 발생이 관찰되지 않거나 기형적인 부리, 또는 날개의 발생을 보여주는 사례가 있었다. Marker gene으로 사용한 eGFP gene은 개체내에서의 지속적인 발현이 발생에 있어서 cytotoxicity를 나타낸다는 보고(Anthony 등, 1999)가 있었으며 본 실험에서도 유사한 결과가 나타났다.

Retrovirus vector에 의한 성공적인 유전자 전이에 대한 확인을 위하여 virus를 주입한 군 중 21일령까지 발생한 배의 조직을 절취하여 DNA를 분리한 후 PCR을 수행하였다. 그 결과 386 bp의 eGFP와 686 bp의 Neo gene에 대한 PCR product를 전기영동 상에서 확인하여 외래 유전자의 도입이 이루어졌음을 증명하였다(Fig. 3).

Retrovirus vector를 이용한 형질전환 동물의 생

Table 4. Efficiency of gene transfer to chicken embryos

| Medium | No. of eggs injected | No. (%) of eggs surviving | | No. of LN β eGFP + embryos |
|-------------------|----------------------|---------------------------|---------|----------------------------------|
| | | 10 days | 20 days | |
| DMEM/FBS | 50 | 38 (76) | 21 (42) | |
| pre-concentrated | 50 | 30 (60) | 18 (36) | 18 |
| post-concentrated | 100 | 54 (54) | 21 (21) | 21 |

To each freshly laid egg, 10 μ l of DMEM/FBS, pre- or 100X post-concentrated virus stock was injected into the blastoderm layer of stage X chicken embryos, then incubated for 20 days before GFP assay.

산에 있어서 가장 문제가 되는 chimerism 현상을 극복하기 위하여 초기 배의 세포 수에 대한 virus particle의 수적 증가를 시도하였다. 그 일환으로 농축을 하지 않는 virus stock과 초원심분리 방법으로 100배 농축한 virus stock (1×10^7 CFU/ml)을 10 μ l의 동일한 양으로 계란의 배하층 내로 주입하였다. 농축 전과 후의 virus stock을 주입한 각각의 군에서 10일배에서는 생존율에 있어서 큰 차이를 나타내지는 않았으나 20일 배에서는 15%의 생존율의 차이를 보였다(Table 4). 또한 20일령의 생존한 배에서는 PCR에 의해 유전자의 도입이 대부분의 개체에서 확인되었다(Table 4).

그러나 농축전의 virus stock을 주입한 경우 동일 개체 내에서 조직별로 chimerism 현상을 일부 나타내었는데(Fig. 4), 이러한 현상은 고농도로 농축한 virus stock을 주입하여 세포에 대한 virus의 상대적인 비율을 증가함으로써 극복할 수 있을 것이라고 사료된다. 이에 본 실험실에서는 농축 후의 virus stock을 계란에 주입하여 chimerism 현상의 발생 정도를 관찰하는 연구가 진행 중이다.

조직에서 분리한 RNA를 RT-PCR한 결과와 조직을 frozen section하여 형광현미경하에서 GFP의 발현을 관찰한 것의 결과는 성공적이지 못하였다. 이러한 현상은 Table 3에서 나타난 바와 같이 GFP 발현이 배의 발생에 유해한 영향을 나타내는 것에서 기인한 현상으로 생각된다(Anthony 등, 1999). 즉 체내에 인위적으로 전이된 외래 유전자의 지속

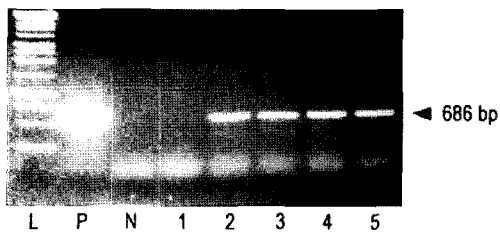


Fig. 4. PCR analyses of 10 different organs derived from # 1 chicken of Fig. 3. L: 100 bp ladder, P: Positive control, N: Negative control, 1: brain, 2: lung, 3: liver, 4: testis, 5: small intestine.

적인 발현이 생리적 균형을 손상시키는 부작용을 보일 뿐만 아니라(Vize 등, 1988; Ebert 등, 1988) 배발달에도 심각한 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구실에서는 현재 널리 사용되고 있는 β -actin promoter나 CMV (cytomegalovirus) promoter 대신에 tissue specific promoter나 inducible promoter를 사용한 retrovirus vector system을 구축 중이다. 이 promoter를 이용하여 조직과 발달 단계에 따른, 혹은 inducer의 존재 여부에 따른 유전자 발현의 정도를 조절하는 것이 가능하게 되면 조류에 대한 보다 효과적 gene transfer system이 확립될 수 있을 것이다.

IV. 요약

형질전환 가금의 생산에 있어서 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 배발달에 의한 급격한 세포의 수적 증가로 인해 고감염성의 virus의 획득이 요구되므로, 이를 위하여 virus stock의 농축에 있어 보다 안정적이고 pantropic인 vesicular stomatitis virus (VSV G) glycoprotein를 envelope로 가지는 pseudotyped retrovirus vector system을 이용하였으며, marker gene으로 *eGFP* gene이 발현되는 retrovirus를 생산하였다. 이 virus를 이용하여 여러 가지 표적세포와 primary culture한 CEF 세포를 감염시켜 GFP의 발현을 확인하였으며, 농축한 virus stock은 stage X의 계란을 선택하여 windowed egg를 제작한 후 배하층에 주입하였다. 형질전환 닭은 정상 발생한 닭에 비하여 저조한 발생율을 보였으나 PCR을 이용하여 외래 유전자의 도입을 확인한 결과 100%인 것으로 나타났다. 또한 한 개체 내에서 유전자의 도입이 폐, 간, 정소, 소장 등의 여러 장기에서 확인되었다.

V. 인용문헌

1. Anthony, C., Perry, F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284:1180-1183.
2. Bosselman, R. A., Hsu, R.-Y., Boggs, T., Hu, S., Bruszewski, J., Ou, S., Souza, L., Kozar, L., Martin, F., Nicolson, M., Rishell, W., Schultz, J. A., Semon, K. M. and Stewart, G. 1989. Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic cells of the unincubated chicken embryo. *J. Virol.*, 63:2680-2689.
3. Brazolot, C. L., Pritttr, J. N., Etches, R. J. and Gibbins, V. A. M. 1991. Efficient transfection of chicken cells by lipofectin, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:304.
4. Ebert, K. M., Low, M. J., Overstrom, E. W., Buonomo, F. C., Baile, C. A., Roberts, T. M., Lee, A., Mandel, G. and Goodman, R. H. 1988. A moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Mol. Endo.*, 2:277-283.
5. Eyal-Giladi, H., Ginsburg, M. and Fabarov, A. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65:139-147.
6. Gavora, J. S., Benkel, B., Sasada, H., Cantwell, Q. J., Fiser, P. and Sabour, M. P. 1991. An attempt at sperm-mediated gene transfer in mice and chickens. *Can. J. Anim. Sci.*, 71:287-291.
7. Gruenbaum, Y., Revel, E., Yarus, S. and Fainsod, A. 1991. Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chickens. *J. Cell, Biochem.* 15E, 194.
8. Han, J. Y., Shoffner, R. N. and Guise, K. S. 1994. Microinjection and expression of marker gene in the early chicken embryo. *Korean J. Anim. Sci.*, 36(3):244-251.
9. Kim, T., Lee, Y. M., Lee, H. T., Heo, Y. T., Yom, H. C., Kwon, M. S., Koo, B. C., Whang, K. and Roh, K. S. 2001. Expression of the E. coli LacZ gene in chicken embryos using replication defective retroviral vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein envelopes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 14(2):163-169.
10. Lin, S., Galiano, N. Culp., Burns, J. C., Friedmann, T., Yee, J. K. and Hopkins, N. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 265:666-668.
11. Love, T., Gribbn, C., Mather, C. and Sang, H. 1994. Transgenic bird by DNA microinjection. *Bio/Technology*, 12:60-63.
12. Marzullo, G. 1970. Production of chicken chimeras. *Nature*, 225:72.
13. Miller, A. D. and Buttimore, C. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.*, 6:2895-2902.
14. Miller, A. D., Garcia, J. V., Von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C. and Eiden, M. V. 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on Gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.*, 65:2220-2224.
15. Naito, M., Tagima, A., Tagima, T., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J. Reprod. Fertil.*, 102:321-325.
16. Naito, M., Watanabe, M., Kinutami, M., Nirasawa, K. and Oishi, T. 1991. Production of quail-chick chimeras by blastderm cell transfer. *British Poul. Sci.*, 32:79-86.
17. Ono, T., Murakami, T., Mochii, M., Agata, K.,

- Kino, K., Otuuka, K., Ohta, M., Mizutan, M., Yoshida, M. and Eguch, G. 1994. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single cell stage to hatching. *Devel. Biol.*, 161:126-130.
18. Perry, M. M. 1987. Nuclear events from fertilization to the early cleavage stage in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Anat.*, 150:99-109.
 19. Perry, M. M., Morrice, D., Hettle, S. and Sanf, H. 1991. Expression of exogenous DNA during the early development of the chick embryo. *Roux's arch. Dev. Biol.*, 200:312-319.
 20. Salter, D. W., Smith, E. J., Hughes, S. H., Wright, S. E. and Crittenden, L. B. 1987. Transgenic chickens:insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virol.*, 157:236-240.
 21. Sang, H. and Perry, M. M. 1989. Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, *Gallus domesticus*. *Mol. Reprod. Dev.*, 1:98-106.
 22. Savva, D., Page, N., Vick, L. and Simkiss, K. 1991. Detection of foreign DNA in transgenic chicken embryos using the polymerase chain reaction. *Res. in Veterinary Sci.*, 50:13-133.
 23. Shuman, R. M. and Shoffner, R. N. 1986. Gene transfer by avian retroviruses. *Poult. Sci.*, 65: 1437-1444.
 24. Simkiss, K., Rowlett, K., Bumstead, N. and Freeman, B. M. 1989. Transfer of primordial germ cell DNA between embryos. *Protoplasma*, 151:164-166.
 25. Vick, L., Li, Y. and Simkiss, K. 1993. Transgenic bird from transformed primordial germ cells. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 251:179-182.
 26. Vize, P. D., Michalska, A. E., Ashman, R., Lloyd, B., Stone, B. A., Quinn, P., Wells, J. R. E. and Seamark, R. F. 1988. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. Cell Sci.*, 90:295-300.
 27. Watanabe, M., Kinutami, M., Naito, M., Ochi, O. and Takashima, T. 1992. Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development*, 114:331-338.
 28. Yee, J.-K., Friedmann, T. and Burns, J. C. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in Cell Biol.*, 43:99-112.
- (접수일자: 2001. 4. 16. / 채택일자: 2001. 5. 10.)