

체외 배양된 닭 배반엽 세포에 대한 Retrovirus Vector를 이용한 유전자 전이

박성준 · 구본철 · 권모선 · 최휘건 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학

Retrovirus Vector-Mediated Gene Transfer to the Chicken Blastodermal Cells Cultured *In Vitro*

Sung Joon Park, Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Whi Gun Chae and Teoan Kim[†]

Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study is to establish a basic culture system enabling *in vitro* culture of chicken blastodermal cells and to test the feasibility of retrovirus-mediated gene transfer to the cultured cells. The blastodermal cells were isolated from freshly laid eggs of stage X and cultured with or without STO feeder layer cells. Stem cell-like morphology was maintained after multiple passages and RT-PCR analysis proved expression of several stem cell specific genes. Immunocytochemical analysis using antibodies of anti-EMA-1 and anti-SSEA-1 also showed the feature of stem cells. Infection of the cultured blastodermal cells with LNCGW retrovirus vector resulted in successful transfer of foreign genes. The results of this study may be useful in establishing stem cell-mediated transgenic chicken production.

(Key words : Chicken blastodermal cell, RT-PCR, Immunocytochemical analysis, Retrovirus vector, Transgenic chicken)

서 론

줄기세포는 신체 내 모든 조직을 만들어낼 수 있는 기원세포이다. 배아 줄기세포주 확립을 위해서는 먼저 수정란에서 세포를 분리해 내고 이를 체외에서 적절한 성장 인자가 포함된 배양액을 사용하여 세포의 증식에 도움을 주는 기저세포와 공배양시키면 세포 집락을 형성하며 증식하고 고유의 특성을 유지한다.

배아 줄기세포는 생쥐(Evans와 Kaufman, 1981)를 시작으로 하여 소(First 등, 1994), 돼지(Wheeler, 1994), 토끼(Giles 등, 1993) 등에서 체외배양을 통해 시도되거나 확립되었고, 현재 인간의 줄기세포까지 진행된 상황이다(Thomson 등, 1998; Shambloott 등, 1998). 원시 생식 세포(primordial germ cell)를 이용한 다능성 생식세포주의 확립에 관한 연구는 현재까지 소(Cherny 등, 1994), 돼지(Piedrahita 등, 1997; Shim 등, 1997) 등에서 시도되었으며, 체외배양 후 형태학적 특징 및 체외분화 능력 등을 검증하였다. 그러나 조류의 다능성 줄기 세포에 관한 연구 결과 보고는 매우 한정적이다. Pain 등(1996)은 최초로 닭의 배반엽 세포(blastodermal cell)를 이용한 체외배양을 성

공하였으며, 체외 분화 능력 검증을 통하여 다양한 조직으로 분화됨을 증명하였다. 그러나 확립된 장기 배양의 닭 줄기세포를 이용한 생식선 키메라를 생산하지 못하였다. Kim 등(2004)은 메추리 배아의 혈액으로부터 원시 생식 세포를 분리하여 체외배양한 후 stage X 시기의 다른 배아로 도입하여 chimera를 생산하였다. 이와 같이 조류의 다능성 줄기 세포에 관한 연구는 포유동물에 비해 매우 제한적이다. 이에 본 연구에서는 조류인 닭에 있어서 배반엽 세포의 세포주 확립을 하고자 하였다.

닭(*Gallus domesticus*)과 같은 가금류는 포유동물과 비교하여 볼 때 번식 기관의 해부 생리학적 구조와 초기배의 형태 및 발생에 있어서 많은 차이점이 있다. 포유동물의 배는 실험과 연구에 필요한 충분한 수를 확보하기에 어려움이 많은데 반하여 닭의 경우 실험에 사용되는 다양한 발생 단계의 배를 계란으로부터 쉽게 구할 수 있고 관찰하기가 용이하다. 그러나 가금의 경우 방란 직후인 stage X 시기의 배는 이미 약 40,000~60,000개의 세포로 분열된 상태(Eyal-Giladi와 Kochav, 1976)이므로 단세포성인 포유류의 수정란에 유전자를 전이하는 방법을 그대로 적용해서는 효율적인 외래 유전자의 도입이 어렵다.

형질전환 닭을 생산하는데 있어서 현재까지 가장 많이

* 이 논문은 농림수산식품부(농림, 식품, 수산)기술개발사업의 지원과 2010년도 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 지원(과제번호: 2010-0301-061-057-001), 2100년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2010-0001359).

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4469, E-mail: takim@cu.ac.kr

사용되는 방법은 retrovirus의 감염성을 이용하여 갖 산란된 계란(stage X)의 배반엽 세포에 외래 유전자를 전이시키는 방법이다. Koo 등(2004)은 ISA Brown계의 수정란 satge X에 LNCGW virus를 미세 주입하여 부화시킨 결과, 창자, 모래주머니, 근육, 부리에서 EGFP 유전자의 발현을 관찰하였다. 그러나 이 방법의 단점은 ① retrovirus vector로는 intron 등이 포함된 염기 서열이 긴 유전자를 전이시킬 수 없고 ② 고감염성을 가진 고농도의 retrovirus vector 용액을 얻기가 어려우며, ③ 이러한 여러 가지의 단점으로 인해 형질전환 닭 생산의 성공률이 저조하다는 것이다. 이에 대한 대안으로는 배반엽 세포 혹은 원시 생식 세포를 이용하여 형질전환 닭을 생산하는 방법이 있는데, Shin 등(2008)은 메추리의 stage 28 배아에서 분리하여 lentivirus로 감염시킨 원시 생식 세포를 stage 13의 배아에 주입하여 형질전환 메추리를 생산하였다. 이 방법의 가장 큰 장점은 외래 유전자의 전이 및 발현을 *in vitro* 상에서 외래 유전자의 발현이 확인된 세포만을 선발하여 사용하기 때문에 형질전환 닭 생산의 성공률을 현저하게 제고시킬 수 있다는 것이다. 그러나 닭에 있어서 배반엽 세포 혹은 원시 생식 세포의 배양과 외래 유전자 전이에 관한 연구가 아직까지 초보 단계에 있다는 단점을 가진다.

본 실험은 형질전환 닭 생산을 위한 기반 기술로써 수정란으로부터 분리한 배반엽 세포를 장기배양할 수 있는지에 대해 연구하였으며, 장기배양을 거친 세포가 줄기세포의 성질을 가지는지의 여부를 분석하기 위하여 분자생물학적 검정을 실시하였다. 또한 배반엽 세포가 외래 유전자 전이가 가능한지에 대해 알아보기 위해 retrovirus vector system을 이용한 EGFP 유전자 전이를 시도하였다.

실험 방법

닭의 배반엽 세포 분리 및 일차배양

본 연구에 사용한 수정란은 ISA Brown 계통의 난으로써, 산란 후 24시간 이내의 60~62 g 무게의 것을 사용하였으며, 계란의 난각을 70% 알코올로 소독하여 실온에서 3시간 방치한 후 사용하였다. 닭의 배반엽 세포 배양 시에는 0.1% gelatin (Gelatin from bovine skin, Type B; SIGMA-ALDRICH, USA)이 coating된 세포배양 접시를 사용하였으며, 기저세포로는 STO 세포를 사용하였다. 기저세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였으며, 배반엽 세포 분리하기 전 날, 10 μ g/ml의 mitomycin C를 2시간 동안 처리한 뒤 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 없는 PBS로 3회 수세하고 trypsin을 처리하여 0.1% gelatin이 coating된 세포배양 접시에 기저세포를 35 mm 배양 접시에 5×10^4 개 plating하였다. 수정란에서 배반엽을 확보하기 위해 난각을 파각하여 난황 부분을 100 mm 배양 접시로 옮겨준 후, 배반엽 부분에 ring paper를 흡착시켰다. Ring paper의 가장자리 쪽의 난각을 가위로 절취하여 배반엽 부분만을 분리하였다. 분리한 배반엽에 묻어있는 난황은 PBS로 수세한 후, Knockout DMEM (GIBCO 10829)에 15% inactivated FBS (Sigma 5405)와 Na-pyruvate (Sigma 5405) (1 mM), MEM NEAA (MEM Non-Essential

Table 1. Primary culture and subculture medium composition (Unit: %)

	Knockout DMEM	Ham F12/DMEM	BRL cell culture media (conditioned media)
일차배양	33	67	
계대배양		25	75

Amino Acids 1000 X solution; GIBCO 11140-050) (1%), HEPES (GIBCO 15630) (10 mM), L-glutamine (GIBCO 25030-081) (2 mM), 2-mercaptoethanol (Sigma M7522) (0.1 mM), 그리고 LIF (MILLIPORE LIF1010) (10 ng/ml)를 첨가한 배지에 혼합하여 300 rpm으로 6분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액은 제거하고 남은 pellet을 0.1% gelatin이 coating된 기저세포가 있는 세포배양 접시와 기저세포를 처리하지 않은 세포배양 접시에 각각 배양하였다. 일차배양 배지는 배반엽 세포 분리시 사용한 배지와 새로 조성한 DMEM / HamF12 배지를 33:67 비율로 혼합하여 사용하였다. DMEM / HamF12 배지는 Knockout DMEM과 HamF12를 혼합한 배지에 LIF 대신 bFGF (Sigma F0291) (10 ng/ml)를 첨가하여 사용하였다(Table 1). 모든 세포는 5% CO₂와 37°C 조건에서 배양하였다.

분리한 배반엽 세포의 계대배양

닭의 배반엽 세포의 계대배양 배지는 BRL 세포배양 배지와 HamF12 배지를 혼합하여 사용하였다. BRL 세포배양 배지는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 48시간 배양한 후 0.45 μ m poresize의 filter로 여과하여 준비하였다(Table 1). 이 계대배양 배지에는 IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1; PEPROTECH 100-11) (10 ng/ml)과 LIF (2 ng/ml), Transferrin (Cedarlane, CL1363A) (10 μ g/ml)를 첨가하였다. 계대배양 역시 일차배양과 동일하게 0.1% gelatin이 coating된 배양접시를 사용하였다. 계대배양 시 colony 형태가 형성되어 배반엽 세포가 잘 자란 것을 선별하여 실험하였으며, 과밀하게 증식된 세포는 다시 계대배양하였다.

닭 배반엽 세포의 분자생물학적 검정

닭의 배반엽 세포가 줄기세포의 특성을 가지고 있는지 분석하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 6일간 배양한 배반엽 세포와 15일간 배양한 배반엽 세포에서 Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 0.5 μ g의 total RNA로부터 ImRrom-II reverse transcription system (Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 닭의 줄기세포에 특이적인 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Table 2). PCR 반응은 PCR Master Mix (Promega, USA) 10 μ l에 각각 20 pmol의 “+”와 “-” strand primer, 그리고 합성한 cDNA 2 μ l를 넣어 전체 20 μ l의 양으로 수행하였고, PCR 과정은 95°C에서 5분간 반응시킨 후 95°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였으며, 최종 신장을 위하여 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 PCR 증폭 단편을 확인하였다.

Table 2. Primers used for RT-PCR analysis

Gene	Species	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
GAPDH	chicken	ATCAATGATCCCTTCATCGATCTG (+)	674
		TCATCATACTGGCTGGTTTCTCC (-)	
Lin28	chicken	GCATCTGTAAGTGGTTCAACGTC (+)	302
		GCAGTTGTAGCATCGATCTCCTTT (-)	
Nanog	chicken	CTCCTTGACCACAGAGCAGAAAAC (+)	437
		TAGGGGTCATATCCAGATACGCAG (-)	
Sox2	chicken	GTACATGAACGGATCGCCTACCTA (+)	267
		GGAACAGGTGCACCTCTGGTAGTGT (-)	
PouV	chicken	GCTGCGAATGIGTAAATGGCTTA (+)	457
		ATTGCACATCTCCTGCATGTTGT (-)	
GATA4	chicken	TGAGAAAAGAGGGCATTCAGA (+)	262
		GCAGGATGAATTGAAGATCCA (-)	

면역학적 세포염색에서는 20일간 배양한 닭의 배반엽 세포를 사용하였다. 대조군으로는 생쥐의 줄기세포를 20일간 배양하여 사용하였다. 닭의 배반엽 세포를 PBS로 3회 수세하고 10% formaldehyde neutral buffer로 4°C에서 30분 동안 세포를 고정시켰다. 그 후 20% BSA가 포함된 Tris-HCl buffer (0.05 mmol/ml)로 4°C에서 30분간 Blocking시킨 다음 1% BSA가 포함된 Tris-HCl buffer (0.05 mmol/ml)에 anti-SSEA-1항체(mouse-anti-SSEA-1 monoclonal immunoglobulin M antibody) (Developmental Studies Hybridoma Bank, MC 480)와 anti-EMA-1항체(mouse-anti-EMA-1 monoclonal antibody) (Developmental Studies Hybridoma Bank)를 각각 1:30과 1:50 비율로 혼합한 반응액으로 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후, PBS로 3회 수세하고 LSAB+System-AP kit (Dako North America Inc. K0678)를 사용하여 발현 양상을 확인하였다.

닭의 배반엽 세포에 Retrovirus Vector System을 이용한 외래 유전자 전이

닭의 배반엽 세포에 retrovirus vector system을 이용한 외래 유전자의 전이 가능성을 알아보기 위해 1,000배로 농축된 LNCGW (Kim 등, 2004)를 사용하였다(Fig. 1). 외래 유전자 전이는 배양 접시 바닥에 부착된 세포를 감염시키는 방법과 부착되기 전 부유 상태의 세포를 감염시키는 방법으로 실시하였다. 먼저, 부착된 세포를 감염시키는 방법의 경우 일차배양 중인 배반엽 세포 중에서 colony 형태가 가장 잘 형성된 세포를 선별하였다. 배반엽 세포를 PBS로 수세한 후, 0.1% trypsin 용액으로 5분간 처리하였다. 분리된 배반엽 세포는 계대배양 배지를 이용해 pipette으로 세포를 풀어 준 후에 gelatin이 coating된 35 mm 세포배양 접시에 1.5 ml의 계대배양 배지

로 plating하였다. 다음날, 배반엽 세포가 부착된 뒤에 1,000배로 농축된 LNCGW 10 µl와 5 µg/ml의 polybrene을 첨가하였다. 부유 상태의 세포를 감염시키는 경우에는 세포를 plating한 직후에 부착된 세포를 감염시키는 경우와 동일한 양의 virus와 polybrene을 첨가해 주었다. 각 세포에서의 EGFP 유전자의 전이 및 발현 여부는 형광 현미경을 이용해 관찰하였다.

결 과

배반엽 세포의 In Vitro 배양

먼저, stage X의 수정란으로부터 분리한 배반엽 세포를 배양할 시에 기저세포의 필요 여부를 실험하였다(Fig. 2).

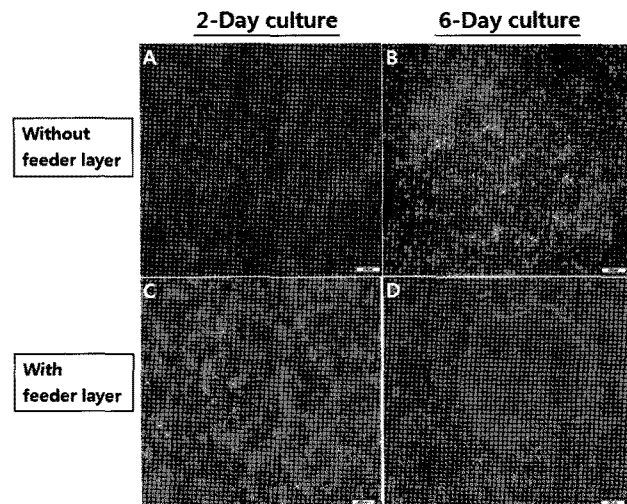


Fig. 2. Culture of chicken embryonic cells isolated from blastodermal cells of stage X embryos. (A) and (B), embryonic cell cultured without feeder layer; (C) and (D), embryonic cells cultured on the top of feeder layer. (A) and (C), embryonic cells cultured for 2 days; (B) and (D), embryonic cells cultured for 6 days. The length of each scale bar is 200 µm.

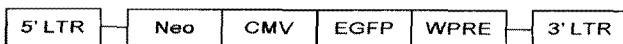


Fig. 1. Structure of LNCGW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo, neomycin resistant gene; CMV, cytomegalovirus promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

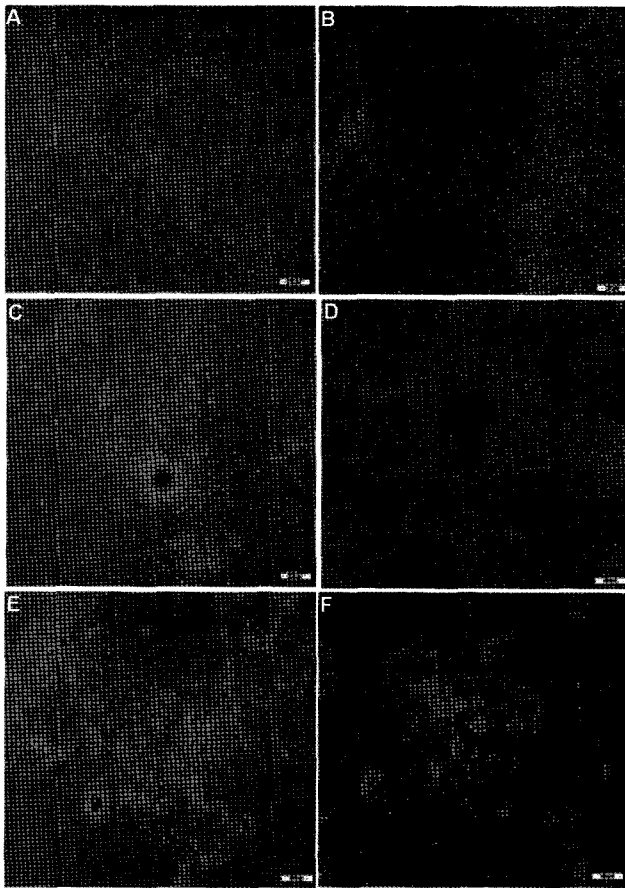


Fig. 3. Long-term culture of chicken embryonic cells without feeder layer. Cell were trypsinization every one week and subcultured on the top of gelatin-coated dishes for 2 days (A), 7 days (B), 10 days (C), 20 days (D), 35 days (E), and 40 days (F). Each scale bar represent 200 μm length.

기저세포를 사용한 경우의 배반엽 세포는 명확한 형태의 colony를 광학 현미경을 통해 확인할 수 있었다. 그러나 기저세포를 사용하지 않은 세포배양 접시의 배반엽 세포의 경우 colony의 형태가 뚜렷하지 않았으며 증식 속도가 약 1.5일 가량 늦음을 알 수 있었다(data not shown). 기저세포가 없이 배양한 배반엽 세포의 경우, 광학 현미경을 통해 관찰한 결과, 배양 10일 쯤부터 colony가 형성되기 시작하였으며, 총 40일간 6~7일 간격으로 5회 이상 계대 배양을 할 수 있었고, 그 동안 모든 세포는 줄기세포 고유의 형태를 유지하였다(Fig. 3).

배아 줄기세포 여부에 대한 분자 생물학적 및 세포 면역학적 검정

본 연구에서 배양한 배반엽 세포가 줄기세포의 특성을 가지고 있는지의 여부를 검정하기 위해 6일간 배양한 세포와 15일간 배양한 배반엽 세포에서 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA로부터 ImProm-II reverse transcription system를 이용하여 cDNA를 합성한 다음 줄기세포임을 확인할 수 있는 primer로 PCR을 실시한 결과, 두 세포주에서 예상된 PCR 증폭 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

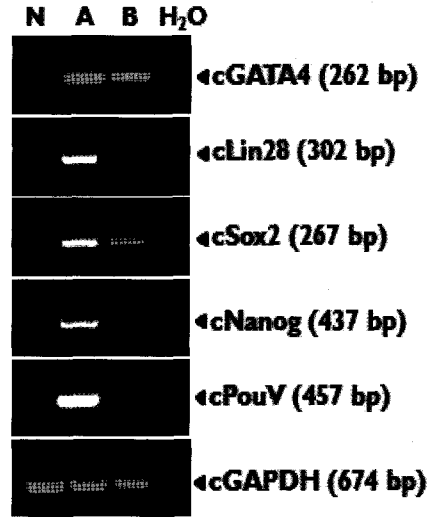


Fig. 4. Determination of stem cell-like expression. RT-PCR analysis was performed using 5 primer sets specific to the 5 stem cell maker genes as described in Materials and Methods. The primer set for GAPDH gene was used as a control. N, DNA isolated from chicken wing tip; A and B, DNA from chicken blastodermal cells cultured for 6 and 15 days, respectively.

면역학적 세포염색에서 20일간 배양한 배반엽 세포를 anti-SSEA-1 항체와 anti-EMA-1 항체를 이용하여 염색하였다. 이의 대조군으로 생쥐 줄기세포를 사용하였으며, 염색한 핵의 착색 반응이 생쥐와 닭의 두 세포에서 동일하게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 배반엽 세포가 줄기세포의 특징을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

Retrovirus Vector System을 이용한 외래 유전자 전이 분리한 배반엽 세포에 외래 유전자 전이 여부를 확인하

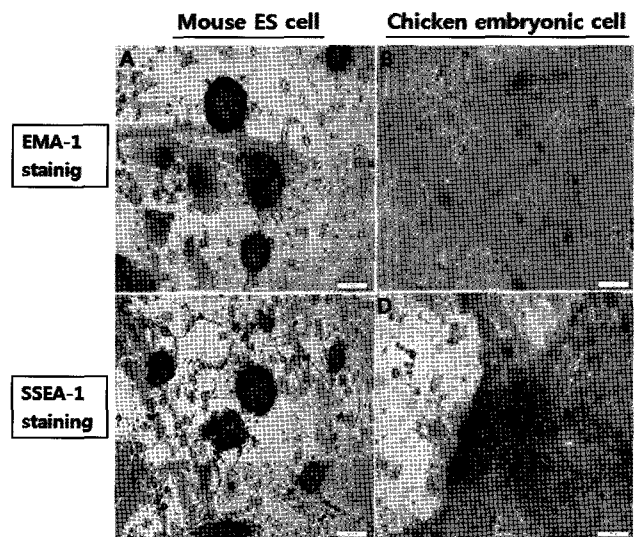


Fig. 5. Immunostaining with SSEA-1 and EMA-1 pluripotency markers. Mouse ES cell (A and C) and chicken embryonic cell (B and D) were stained with either EMA-1 (A and B) and SSEA-1 (C and D). Each scale bar represents 100 μm length.

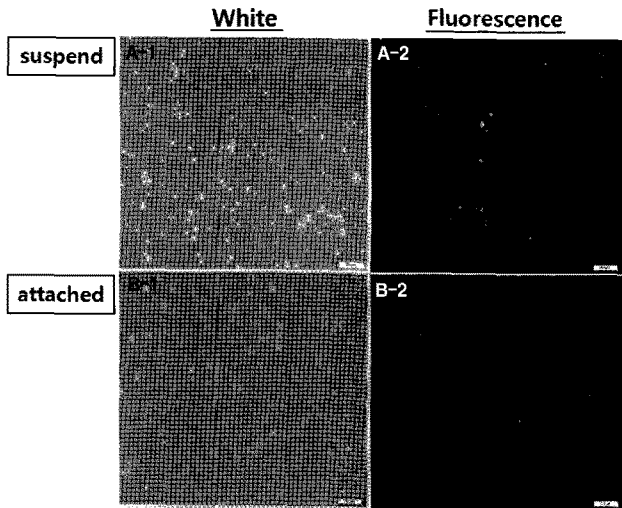


Fig. 6. LNCGW virus were applied to either suspended (A) or attached (B) cells, then observed under either white or fluorescence light after 3 days of infection. Each scale bar indicates 200 μ m of length.

기 위해 세포가 배양접시 바닥에 부착한 경우와 부유한 경우로 나누어 각각 동일한 virus로 감염시켰다. LNCGW virus로 감염 후 형광 현미경(emission 509 nm, excitation 489 nm)으로 관찰한 결과, 부유 상태의 세포에 virus를 감염한 경우에 보다 많은 GFP⁺ 세포를 확인하였다(Fig. 6). 이 결과로 미루어 볼 때 배반엽 세포를 부착하여 LNCGW를 감염시키는 것보다 부착되기 전의 세포에 virus를 감염시키는 것이 외래 유전자 전이 효율이 더 높은 것임을 알 수 있었다.

고찰

다능성 세포주의 확립은 현재 전 세계적으로 가장 활발히 진행되고 있는 연구 분야로 무한한 활용성을 가진다. 다능성 세포주의 확립에 관한 연구는 현재까지 주로 포유동물에서 이루어졌는데, 본 연구에서는 조류, 특히 닭에 있어서의 다능성을 가진 배반엽 세포주 확립과 확립된 세포주에 외래 유전자 전이 가능성을 검정하고자 하였다.

배반엽 세포를 이용한 germline chimera의 생산 연구는 1990년대부터 꾸준히 행해져 왔다(Petitte 등, 1990; Pain 등, 1996). Petitte 등(1990)은 배반엽 세포를 이용하여 chimera를 생산하였으나, *in vitro*에서 배반엽 세포를 장기 배양하거나 세포의 특성을 분석하여 줄기세포를 포함하고 있음을 증명하지는 못하였다. 그 후, Pain 등(1996)이 배반엽 세포를 분리하여 장기간 *in vitro*에서 배양하면서 ES 세포의 특성을 유지하고 있음을 여러 실험을 통하여 증명하였다. 배반엽 세포는 생쥐의 ES 세포와 유사한 형태학적 특징인 큰 핵을 가진 작은 크기의 세포가 밀집하여 집락을 형성하였다. 또한, ES 세포에 특이적인 항체인 SSEA-1이나 EMA-1 등과 반응하며, 성장인자에 의존적으로 증식하고 높은 telomerase 활성을 나타내었다(Pain 등, 1996). 이러한 세포는 *in vitro* 상에서 외배엽, 중배엽, 그

리고 내배엽성 조직의 다양한 세포 형태로 분화되는 능력을 가지고 있다. 또한, 배양한 세포를 배아로 주입하여 chimera를 생산함으로써 *in vitro*에서 배양한 세포가 줄기세포의 특성을 유지하고 있음을 증명하였다(Pain 등, 1996). 본 연구에서 분리 배양한 배반엽 세포들도 선행된 타 연구와 유사한 형태학적 특징과 항체 반응 등의 결과를 나타내었으므로 줄기세포의 성질을 가지고 있는 것이 확인되었다. 본 연구에서 분리한 배반엽 세포는 ES 세포의 분화를 억제하는 인자로 알려진 FGF와 LIF를 첨가한 배지에서 배양하였다(Rathgen 등, 1990; Matsui 등, 1992). 이 인자가 첨가된 배지에서 배양한 배반엽 세포는 40일 이상의 장기 배양에서도 줄기세포의 특징을 유지하고 있었으며, 별다른 분화 양상을 나타내지 않았다.

여러 연구를 통하여 배반엽 세포에는 줄기세포의 특징을 가지는 세포가 포함되어 있음을 확인하였는데, 이 세포들을 분리, 배양, 유전자 도입, 그리고 선별 후 증식하여 고수준의 chimera를 생산한 연구 결과가 최근에 보고되고 있다. Zhu 등(2005)은 Stage X 시기(Eyal-Giladi와 Kochav, 1976)의 배반엽 세포로부터 분리한 ES 세포에 외래 유전자를 전이시켜서 human monoclonal antibody가 계란으로 분비되는 chimera를 생산하였다. 배반엽 세포는 아니지만 줄기세포의 특성을 가진 PGC를 이용한 형질전환 닭의 생산 연구도 이루어졌다. van de Lavoie 등(2006)은 stage 14~17 (Hamburger와 Hamilton, 1951) 시기의 배아로부터 PGC를 분리 배양하여 외래 유전자를 전이시킨 후, 이 세포를 동일한 시기의 다른 배아로 주입하여 germline chimera를 생산하였다. 이상의 ES 세포를 이용한 형질전환 닭을 생산하는데 가장 큰 문제점은 외래 유전자의 전이율이 매우 저조하다는 것이다(Wang 등, 2006). 특히 배반엽 세포에 대한 유전자 전이율은 더욱 낮은 것으로 보고되어 있는데, 이는 배반엽 세포의 특성상 집락을 이루어 성장하기 때문에 유전자가 전이되지 못한 세포의 증식으로 인하여 유전자가 전이된 세포의 증식이 방해되기 때문이다. 따라서 세포의 군집 형성의 밀도가 낮은 조건에서 외래 유전자의 전이율이 증가할 것으로 예상된다. 뿐만 아니라 보다 효율적인 유전자 전이 system을 구축하여 적용함으로써 외래 유전자의 전이율을 향상시켜야 한다. 이에 본 연구에서는 LNCGW retrovirus vector system을 이용하여 배반엽 세포로의 외래 유전자 전이율을 증가시키고, virus 감염시 배반엽 세포의 배양 조건을 최적화하여 보다 효율적인 감염이 이루어질 수 있도록 하였다. 감염 시에 배반엽 세포가 부착했을 시와 부유했을 시를 나누어 감염시켜 비교하였는데, LNCGW virus는 배양 접시에 부착된 세포보다 부착되지 않은 상태의 세포에서 보다 높은 감염의 효율성을 나타내었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로, 본 연구에서 확립한 닭의 배아세포와 외래 유전자의 전이 방법에 관한 기술은 장차 줄기세포를 이용한 형질전환 닭의 생산과 조류 발생학의 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 배반엽 세포에 고부가가치의 단백질에 대한 외래 유전자를 도입하여 형질전환 닭을 생산함으로써 조류를 생체반응기로 사용할 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

1. 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.
2. Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
3. Eyal-Giladi H, Kochav S (1976): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev Biol* 49:321-337.
4. First NL, Sims MM, Park SP, Kent-Frist MJ (1994): Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reprod Fertil Dev* 6:553-562.
5. 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 blastocysts or morulae. *Mol Reprod Dev* 36:130-138.
6. Hamburger V, Hamilton (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
7. Kim JN, Kim MA, Park TS, Kim DK, Park HJ, Ono T, Lim JM, Han JY (2004): Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Molecular reproduction and development* 68:81-87.
8. Kim YH, Koo BC, Kwon MS, Kim T (2004): Expression comparison of the *GFP* gene under the controls of several promoters in the retrovirus vectors with or without WPRE sequence. *Reprod Dev Biod* 28:191-196.
9. Koo BC, Kwon MS, Chol BR, Lee HT, Chol HJ, Kim JH, Kim NH, Jeon IS, Chang WK, Kim T (2004): Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Molecular Reproduction and Development* 68:429-434.
10. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM (1992): Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.
11. Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Ethes RJ (1996): Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.
12. Petite JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Ethes RJ (1990): Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108:185-189.
13. 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.
14. Rathgen P, Toth S, Willis A, Heath J, Smith AG (1990): Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. *Cell* 62:1105-1114.
15. Shambloot 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.
16. 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.
17. Shin SS, Kim TM, Kim SY, Kim TW, Seo HW, Lee SK, Kwon SC, Lee GS, Kim H, Lim JM, Han JY (2008): Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. *FASEB J* 22:2435-2444.
18. 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.
19. van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love CM, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ (2006): Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441:766-769.
20. Wang Y, Brooks CF, Jones SA, Olliff LK, Morgan M, Speksnijder GL, Foley C, Harvey AJ (2006): Progress toward the culture and transformation of chicken blastodermal cells. *Stem Cells* 24:1638-1645.
21. Wheeler MB (1994): Development and validation of swine embryonic stem cells a review. *Reprod Fertil Dev* 6:563-568.
22. Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, Kay RM, Kerchner A, Leighton PA, Mather-Love CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiacinto P, Wong S, Zhou W, Etches RJ (2005): Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 23:1159-1169.

(접수일자: 2010. 9. 15 / 채택일자: 2010. 9. 20)