

다양한 정자세포를 이용한 형질전환 돼지수정란의 생산성 및 Mosaicism 빈도 조사

송상진^{1,2}, 최경희¹, 임천규², 민동미², 박용석², 강인수³, 이훈택¹, 정길생¹
 건국대학교 동물자원연구센터¹, 삼성제일병원 여성의학연구소 생식내분비 및 불임연구실²

착상전 수정란 단계에서 형질전환 수정란의 선발은 형질전환동물의 효율을 증대시킬 수 있는 방법이다. 성공적인 형질전환동물의 생산을 위해서는 생산된 수정란의 mosaicism 빈도를 감소시켜 전체 할구에서의 유전자 발현을 유도하는 것이 최적인 것이다. 따라서 본 연구에서는 돼지의 음성 생식세포를 이용한 형질전환동물의 생산에 있어서 다양한 정자세포 이용시 형질전환 수정란의 생산성 및 mosaicism 빈도를 조사하였다. 아울러 돼지 음성생식세포내 GFP 유전자도입시 세포들의 생존율 및 원형정자세포분리 후 배양에 따른 형태적 변화를 관찰하였다. 돼지의 음성 생식세포내 GFP 유전자 도입은 전기자극법 (1.3 kV/cm, 200 μ s) 에 의하여 수행되었으며, 이 때 생존율은 60-70%이었다. 유전자가 도입된 전체 세포 중 원형정자세포군의 분리는 유식세포분리기에 의하여 수행하였으며, 전체집단에 대한 분리군의 비율은 평균 16.2%이었다. 형질전환 수정란의 생산은 정자 (ICSI), 원형정자세포 (ROSI), 배양후 확장된 원형정자세포(ELSI)를 이용하였으며 각각의 난할율은 ICSI (82.9%), ROSI (59.1%), ELSI (62.1%)로 유의한 차이를 나타내었다. 그리고 8세포기까지의 배발달율은 각각 61.1, 40.9 및 48.6%이었으며, 상실배 및 포배기형성율은 각각 24.6, 18.1 및 32.4%이었다. 형광현미경하에서 GFP 단백질이 발현된 8세포기 수정란을 대상으로 각각의 할구를 primer extension preamplification (PEP) PCR 방법으로 분석한 결과, ICSI 및 ROSI 실시후 대부분 (15/20, 9/10) 의 수정란은 3~4개의 할구에서만 GFP 유전자의 존재여부를 확인할 수 있었으며, 전체 할구에서 GFP 유전자가 모두 확인된 수정란은 없었다. 반면에 배양된 확장 원형정자세포를 이용하여 생산한 수정란의 경우, 4/10 (40%)에서 전체 할구내에 GFP 유전자의 존재를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 비록 배발달율 및 GFP 유전자 발현율에 있어서는 ELSI방법이 ICSI 등의 방법보다 현저히 낮았지만, mosaicism 빈도가 낮아 바람직한 형질전환 수정란 생산에서는 오히려 유용한 방법이라고 사료된다. 또한 외래 유전자의 도입효율 면에서 후기 원형정자나 성숙정자보다 초기 원형정자세포에 외래 유전자를 도입한 다음, 성숙시킨 확장원형정자세포를 이용하는 방법이 보다 우수하다는 것을 시사하였다. 따라서 본 연구결과는 포유동물의 음성 생식세포를 이용하여 nonmosaicism을 나타내는 형질전환 수정란을 생산하고 선발할 수 있는 일련의 기술적 과정을 정립하였다고 사료된다.

(Key words) 음성생식세포, ELSI, mosaicism, PEP PCR, 형질전환 돼지수정란