

家禽의 遺傳物質傳達體로서의 原始生殖細胞의 利用

呂 政 秀

嶺南大學校 畜產學科

Utilization of Primordial Germ Cell (PGC) as Transferor of Avian Genetic Materials

Yeo, Jung Sou

Department of Animal Science, Yeungnam University

Summary

Utilization of primordial germ cell (PGC) as transferor of genetic materials is great potential in manipulating genes to promote genetic performances in chicken.

This study explored that PGCs from early embryos as vehicle for molecular breeding strategies were isolated, these chromosomally marked donor PGCs were transplanted to germinal crescent of host embryos, and genetic materials of donor PGC were identified at the proliferative stage in host gonads.

I. 緒 論

家畜의 生産能力 증진에 관한 研究는 1960年代의 단순한 交配와 확률통제에 근거한 선발에서 1970年代에는 遺傳物質의 本質인 染色體의 分析단계로 발전하여 1980年代에는 遺傳因子 즉 DNA의 구성을 규명하여 이를 조작하는 遺傳工學(genetic engineering) 단계에서 연구가 진행되어지고 있다.

이미 呂와 Shoffner(1986), Hughes 등(1979), Leung 등(1975), Kit 등(1974)이 닭에서 體細胞融合(somatic cell hybridization)이나 in situ hybridization 기술로 다수의 遺傳因子를 밝혔다.

이와같이 밝혀진 遺傳因子를 조작하는 연구로서 Perucho 등(1980)은 制限酵素(restriction enzyme)과 plasmid(PBR 322)를 이용하여 닭에서 Thymidine Kinase gene을 분리하였고 Shoffner와 Guise(1984)는 遺傳物質傳達體(genetic vector)로서 原始生殖細胞(primordial germ cell, PGC)를 이용할 수 있음을 밝혔으며 Mcknight 등(1983)은 닭의 Transferrin 유전자를 생쥐의 受精卵 雄性前核(male pronucleus)에 주입시켜서 30%의 후대에서 닭의 DNA sequence를 발견하였다고 보고하였다. 또한 Shuman 등(1984)은 retro virus를 vector로 하여 닭의

受精卵에 遺傳物質을 주입해서 4%의 後代에서 이식된 遺傳標識(genetic marker)을 발견하였다.

이러한 多樣한 研究 結果를 통하여 家畜의 能力改良 根源을 규명할 수 있는 가능성은 무한하다고 판단되어 本 研究는 밝혀진 특정 遺傳因子를 移植하는 傳達體(vector)로서 닭의 原始性胚兒細胞(primordial germ cell, PGC)의 實用可能性을 밝혀 닭의 能力改良을 꾀하고자 수행되었다.

II. 材料 및 方法

미국 Minnesota 대학에서 30여년간 사육해 온 近交系統인 Rhode Island Red($F_x=80^+$)와 New Hampshire($F_x=50^+$)을 이용하여 Shuman 등(1981)의 方法을 보완하여 PGC의 分離, PGC의 移植 그리고 移植된 PGC의 遺傳物質 확인 단계를 다음과 같이 실시하였다.

1) PGC의 分離

遺傳物質標識(Genetic marker)이 分명한 RIR品種 중에서 1번염색체가 迷位된 개체의 受精卵을 얻어서 24~30시간 37.5°C에서 培養한후 배아를 분리하였다. 분리된 배아의 germinal crescent에서 PGC를 함유하고 있는 體細胞(somatic cell)를 분

37.5°C에서 4시간 培養할 때 體細胞는 배양용기에 표면에 달라붙고 PGC는 배양액에 떠 있기 때문에 쉽게 PGC만을 분리시킬 수가 있고 이들을 移植用 donor로 利用할 수 있다.

2) PGC의 移植

정상적인 染色體像을 가진 host 개체로 근교계수가 제일 낮은 New Hampshire에서 受精卵을 채취하여 28~30시간 배양한 후 受精卵의 暵단부에서 1/4 정도 아랫부분에 5×5mm의 난각을 파각시킨다. Stereomicroscope에서 germinal crescent를 확인하여 micropipett으로 5μ의 donor PGC를 서서히 주입시킨다. 이후 즉시 파각된 부분을 봉한다.

3) Host embryo에서 donor의 遺傳的 標識의 확인은 8~10일동안, donor PGC가 이식된 host 수정란을 배양한 후 파각하여 성장중인 배아로부터 性腺(gonad)을 분리한다. 분리된 性腺은 0.45% sodium citrate 용액에서 10분간 정치시킨 후 50% acetic acid에 고정시켜서 chromosome slide를 만들어 이식된 donor의 遺傳標識을 判明한다.

III. 結果 및 考察

Primordial germ cell(PGC) system은 哺乳動物의 受精卵 移植과 같이 家禽에서 遺傳子 造作에 필수적인 기술로서 donor의 PGC를 體外에서 인위적으로 조작한 후 host embryo에 移植시킬 수 있는 遺傳物質傳達體(genetic vector)로서 利用이 가능한 方法이다.

1. PGC 分離

PGC 分離는 24~30시간동안 37.5°C에서 培養된 8~10 somite의 胚兒(Fig. 1)에서 germinal crescent를 분리하고 4시간동안 培養液(McCoy 5A)에 培養후 배양용기에 달라붙지 않는 세포를 채취하여 Ringer's 溶液에 보관된다. 이후 periodic acid-schiff(PAS)의 染色을 통하여 PGC는 분홍색으로 염색이 되고 또 Fig. 2에서와 같이 일반 體細胞보다 크기 때문에 형태로도 쉽게 判別이 되어진다.

2. PGC 移植

Donor PGC 移植에 사용된 host embryo는 近親度가 비교적 낮은 New Hampshire의 正常的인 受精卵이었으며 28~30시간 37.5°C에서 培養後 受精

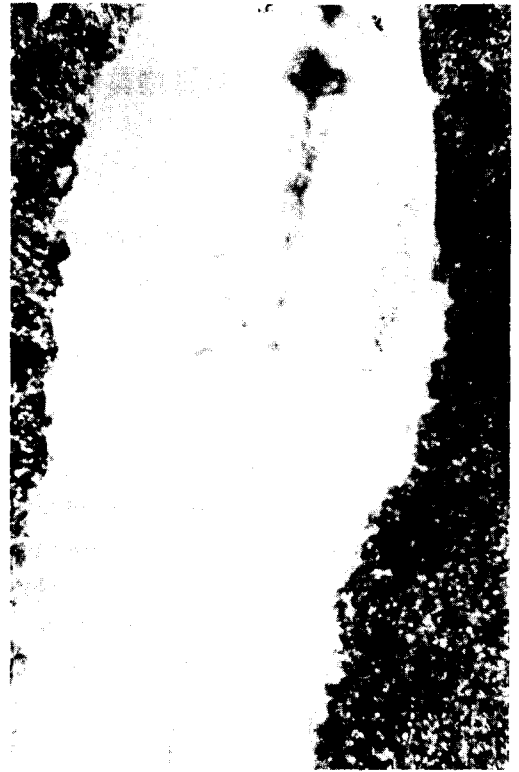


Fig. 1. 10 somite chicken embryo of 30hrs incubation

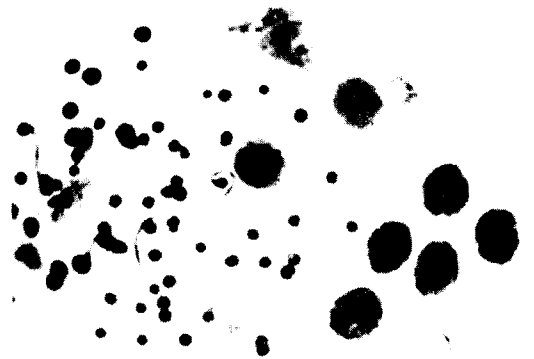


Fig. 2. Primordial germ cells from germinal crescent at 26 hrs embryo (small are somatic cell)

卵의 暵단부에서 1/4 정도 아랫부분에 5×5mm를 파각하여 stereomicroscope에서 host embryo의 germinal crescent를 관찰하였다. 여기서 관찰된 germinal crescent를 固定시켜 놓고 미리 준비된 5μ의 donor PGC를 지름이 30 micron인 micropipet-

te을 이용하여 서서히 注入시킨다. 이때 주입기술은 PGC를 주입시키는 동안 PGC 용액이 卵黃膜 밖으로 유출되지 않도록 해야 한다.

Donor PGC를 注入한 후 즉시 U. V. lamp 아래서 마련된 parafilm으로 1차 파각된 부분을 봉하고 다시 2차로 parafilm과 beeswax(3:1)의 혼합액을 녹여서 봉한다.

이와같이 이식이 끝난 受精卵은 일반 孵化過程에서 발육을 계속 진행시킨다.

3. 移植된 donor PGC의 確認

PGC 이식이 끝난 受精卵을 8~11일 발육시킨 후 즉 PGC의 細胞分裂이 진행되는 시기에 파각하여 성장중인 병아리의 性腺(gonad)을 分離하여 squash 방법으로 染色體를 관찰할 수 있었다.

이때 donor PGC가 host embryo에 이식된 후 성장하여 정상적인 host PGC의 染色體와 donor PGC의 遺傳的 標識인 逆位된 일반 염색체를 발견할 수가 있었다.

Fig. 3에서와 같이 host embryo의 성선에서 발견된 donor PGC의 遺傳的 標識을 갖는 染色體像은 인위적인 PGC 이식이 立證되고 있는 결과였다.

本 研究에서 donor 細胞의 染色體 像 頻度は 1% 정도로 나타났으며 遺傳物質傳達體(genetic vector)로서 이용될 PGC의 遺傳的 能力 發現(genetic performance)은 host embryo가 孵化, 成長하여 性成熟에 도달한 후 즉 PGC 이식후 2번째 世代의 개체에서 나타나게 된다.

Shoffner와 Guise(1984)는 marker를 가진 PGC



Fig. 3. Transplanted chromosome spread marked genetically of donor PGC in host embryo (Arrowis inversed #1)

를 移植한 host embryo의 제 2번째 世代에서 donor의 遺傳的 標識를 가진 개체를 확인하지 못하였고 보고하였는데 이는 本 研究의 結果에서와 같이 이식된 PGC의 出現비율이 낮은 원인으로 생각할 수 있고 또 遺傳的 標識를 가진 PGC와 host PGC와의 生理的인 不均衡도 예상할 수 있음을 지적하였으며 또한 이들은 많은 PGC생산을 위해서 체외의 培養液에서 PGC의 인위적인 배양방법이 중요한 과제임을 시사하였다.

인위적인 배양방법으로 많은 PGC의 생산이 이뤄질 때 PGC의 遺傳物質 造作으로 닭의 能力改良은 容易하게 이룩되리라 期待된다.

IV. 摘要

遺傳物質의 造作기술 중 중요한 단계인 遺傳物質傳達體로서 닭의 原始生殖細胞(primitive germ cell, PGC)를 이용하기 위해서 遺傳的標識(genetic marker)을 가진 胚兒에서 PGC를 分離하여 正常的인 host embryo에 이를 移植시키고 성장중인 host embryo의 性腺에서 donor PGC의 遺傳物質이 發見되므로써 PGC를 利用한 家禽의 遺傳物質 造作이 可能함을 밝힐 수 있었다.

V. 引用文獻

1. Hughes, S.H., E. Stubblefield, F. Payver, J.D. Engel, J.B. Dodgson, D. Spector, B. Cordell, R.T. Schimke and H.E. Varmus, 1979. Gene location by chromosome fractionation: Globin genes are on at least two chromosomes and three estrogen-inducible genes are on three chromosomes. *Genetics*, 76:1348-1352.
2. Kit, S., W.C. Leung, G. Jorgensen, D. Trkula and D.R. Dubbs, 1974. Acquisition of chick cytosol thymidine kinase activity by thymidine-deficient mouse fibroblast cells after fusion with chick erythrocytes. *The Journal of cell Biology*, 63:505-514.
3. Leung, W.C., T.R. Chen, D.R. Dubbs and S. Kit. 1975. Identification of chick thy-

- midine kinase determinant in somatic cell hybrids of chick erythrocytes and thymidine kinase-deficient mouse cells. *Experimental cell Research*. 95:320-326.
4. Mcknight, G.S., R.E. Hammer, E.A. Kuenzel and R.L. Brinster, 1983. Expression of chicken transferrin gene in transgenic mice. *Cell*, 34:355-341.
 5. Perucho, M., D. Hanahan, L. Lipsich and M. Wigler, 1980. Isolation of chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature*, 285:207-210.
 6. Shoffner, R.N. and K. Guise, 1984. Genetic-biotechnological characterization and preservation of poultry germ plasma. *Annual Report of the Minnesota Cooperative Region Project-NC-168*.
 7. Shuman, R.M., 1981. Primordial germ cell transfer in chicken *Gallus Domesticus*. Thesis of the Graduate School of the University of Minnesota.
 8. Shuman, R.M., R.N. Shoffner, M. Emerman and H.W. Temin, 1984. Vertical transmission of REV by inoculation of developing ovarian follicles. A Thesis of the Graduate School of the University of Minnesota.
 9. 呂政秀, 알엔 샤프너. 1986. 體細胞融合에 의한 닭의 遺傳因子 규명에 관한 연구. *韓國畜産學會誌* 28(6) : 392-395.