

Retrovirus Vector 를 생산하는 세포와 공동배양된 소 수정란의 *E. coli LacZ* 유전자 전이와 발현

金泰完·朴世必*

大邱曉星카톨릭大學校 醫科大學

Transfer and Expression of *E. coli LacZ* Gene in Bovine Embryos by Co-culturing with Retrovirus Vector-Producing Cells

Kim, T. W. and S. P. Park*

School of Medicine, Taegu Hyosung Catholic University

SUMMARY

In this study we demonstrate that retrovirus-mediated gene transfer is one of the promising alternatives to the conventional pronuclear DNA microinjection approach, especially in transferring the exogenous genes into the bovine embryos. By co-culturing of zona-free one-cell stage embryos with the retrovirus-producing cells for 24 hours followed by 6 days of culture in virus-free medium, we could get morulae and blastocysts expressing the *E. coli LacZ* genes which were transferred by our retrovirus vector.

The results obtained in this study are summarized as follows :

1. Addition of $5\mu\text{g}/\text{ml}$ of polybrene in the embryo and virus-producing cell co-culture medium did not affect development of zona-free one-cell embryo.
2. Compared with the intact embryos removal of zona at one-cell stage before co-culturing with the virus-producing cells for one day caused only slight decrease of embryo development.
3. Co-culture of 625 zona-free one-cell stage embryos with the virus-producing cells resulted in 65 (10.4%) morulae or blastocysts, and 12.3% (8/65) of the morulae or blastocysts were *E. coli LacZ* positive.

I. 서론

형질전환동물의 생산에 있어서 수정란의 전핵(Pronucleus)에 외래 DNA를 미세주입하는 방법은 1980년 Gordon 등에 의해 처음 도입된 이래, 현재까지 가장 주된 방법으로 인정되고 있으나 이 방법이 고등동물에 응용되었을 때 매우 저조한 형질전환 동물 생산 효율 및 그 방법 사용 자체에 내재된 몇가지 문제점으

로 인하여 형질전환 가축의 생산에는 그 실효성이 의문시 되고 있는 실정이다.

그 대안으로서 배반포강내에 embryonic stem (ES) 세포 도입 혹은 retrovirus vector를 이용한 방법 등이 소개되었으나 이들 방법 역시 생쥐의 경우만 성공을 거두었을 뿐 타 동물에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. ES 세포의 경우 다능성은 쥐 이외에 hamster (Doetschman 등, 1988), 돼지 (Notarianni 등, 1990), 양 (Notarianni 등, 1991) 등에서 보고되었으

*마리아 基礎醫學研究所, 서울 (Maria Infertility Medical Institute, Seoul)

나 전능성은 아직 생쥐 (Nagy 등, 1993)에서만 확립되어 있는 것으로 알려지고 있다. 특히 소에 있어서는 Sims와 First (1994)가 체외생산된 배반포기 유래 Inner cell mass (ICM) 세포를 약 1개월간 체외배양을 유도한 후 이들 세포들을 이용한 핵 치환 방법의 해 4마리의 송아지를 생산하였다는 보고 이외에는 아직 전능성과 다능성을 가진 세포를 확립했다는 보고는 없다. 한편 retrovirus vector system을 이용한 형질 전환 동물 생산은 아직까지 생쥐에서만 성공사례가 발표되었을 뿐인데 (Stewart 등, 1987) 이는 현재까지 개발된 retrovirus vector system은 거의 모두가 murine leukemia virus에 기초를 둔 것으로서 타종의 포유동물 세포들에 대한 retrovirus vector의 낮은 감염도에 직접적으로 기인되는 것으로 알려져 있다.

앞선 연구(Kim과 Park, 1995)에서 밝혔듯이 현재까지 개발된 retrovirus vector system의 낮은 전염율을 제고시키기 위한 일환으로서 retrovirus vector를 생산하는 세포들을 직접 소의 1~4세포기 수정란의 위관강 내에 직접 주입함으로써 현저히 상승시킬 수 있음을 보였다. 그러나 retrovirus vector로 전이된 *E. coli LacZ* 유전자의 발현이 ICM을 구성하는 모든 세포에서 나타나지 않는 관계로 말미암아 일부의 ICM세포에서는 *LacZ* 유전자의 발현을 볼 수 없는 문제점이 도출되었다. 이러한 현상은 다음과 같은 두 가지 원인에 의한 것으로 추정되는데 첫째, 미세주입된 retrovirus vector를 생산하는 세포로부터 생산되는 virus의 초기 blastomere로의 낮은 전염성, 둘째 X-gal 염색시 위관강내에 주입된 virus를 생산하는 세포와 *LacZ* 유전자를 발현하는 blastomere와의 구별이 불가능한 관계로 인하여 virus를 생산하는 세포를 *LacZ*⁺인 blastomere로의 오인 등에 의한 것으로 요약될 수 있다.

이러한 문제점들을 좀 더 구체적으로 구명하기 위하여 본 연구에서는 지난번 연구에서 보고된 ICM세포로부터 발현된 *LacZ* 유전자가 현미경 미세주입된 virus를 생산하는 세포의 감염에 의한 것임을 밝히고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Virus를 생산하는 세포 및 수정란 준비

PG13-LNβZ cl6 virus-producing cell의 구조 및 배양 방법 등은 이미 보고 (Kim 등, 1993) 된 바 있다. 실험에 사용된 수정란은 도살장에 구입한 난소로부터 채취된 미성숙 난포란을 체외성숙 (22±2시간) 및 체외수정을 유도하여 생산된 1-세포기배가 사용되었으며, 이외의 상세한 내용은 Kim 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다.

2. 수정란의 virus 감염

Retrovirus의 투명대의 통과를 용이하게 하기 위해 (Jaenisch 등, 1975) 수정란의 투명대는 수정 후 18±2시간 쯤에 0.1% pronase 용액으로 제거되었다. Virus 감염을 위해 투명대가 제거된 수정란은 앞서 단층배양이 유도된 virus를 생산하는 세포와 24시간동안 공동 배양되었으며, 배양액은 CR1aa (Rosenkrans 등, 1991, 1993) 에 10% heat treated FCS (HT-FCS) 를 첨가하여 사용하였다. 공동 배양시 virus의 흡착율을 높이기 위해 polybrene (5μg/ml)이 배양액에 첨가되었으며 virus infection 단계를 거친 각각의 배는 10μl CR1aa+10% HT-FCS 배양액 소적내에서 8일째 (day 1 = fertilization) 까지 계속해서 배양되었다. 이때 사용된 10μl 소적배양법은 blastomere의 disaggregation을 표면장력을 이용하여 최소화 하는 한편 일상적인 50μl에 여러개의 수정란을 배양할 때 근접한 수정란의 disaggregation된 blastomere와의 혼합을 막기 위해서였다. 배양이 끝난 8일째인 수정란은 *LacZ* 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 X-gal 염색법을 실시하였다 (Kim 등, 1993).

III. 결과 및 고찰

1. 배발달에 미치는 polybrene의 영향

Table 1은 polybrene의 첨가가 1-세포기 수정란의 발달에 미치는 효과를 검토한 결과로서 수정 후 18±2시간째인 수정란을 polybrene (5μg/ml)의 첨가구와 무첨가구에서 24시간 배양한 다음 수정 후 2일째 (≥2-세포기) 와 8일째 (상실배기 혹은 배반포기)에 각각의 배발달율을 조사했을 때 첨가구의 경우 74.2%, 32.2%로서 무첨가구의 71.3%, 30.9%와 유사한 배발달율을 나타냈다. 이러한 결과는 (Kim과 Park, 1995) 이 소의 EBTr (embryonic trachea) 세포를 retrov-

Table 1. Effect of polybrene to embryo development

Treatment	# of 1-cell stage embryo	# of ≥ 2-cell embryo at day 2	# of morula / blastocyst at day 8
w / polybrene	360	267 (74.2)	116 (32.2)
w/o polybrene	230	164 (71.3)	71 (30.9)

* All embryos were cultured in CR1aa+10% HT-FCS supplemented w / or w/o polybrene (5 μ g/ml) for 24hours before culturing for 6 more days in CR1aa+10% HT-FCS drops. 10 embryos cultured in a 50 μ l drop of medium.

Table 2. Effect of ZP to embryo development

Treatment	# of 1-cell stage embryo	# of ≥ 2-cell embryo at day 2	# of morula / blastocyst at day 8	# of Lac Z+
w / ZP	320	260 (81.3)	44 (13.8)	—
w/o ZP	625	450 (72.0)	65 (10.4)	8 (12.8)

* All embryos were cultured in CR1aa+10% HT-FCS supplemented w / or w/o polybrene (5 μ g/ml) for 24hours before culturing for 6 more days in CR1aa+10% HT-FCS drops. Each embryos was cultured in a 10 μ l drop of medium.

irus로 감염시킬 때 사용된 최소 농도 5 μ g/ml은 1-세 포기 수정란의 발달에 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다.

2. 배발달 및 virus 전염성에 미치는 투명대의 영향

앞서 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 virus의 전염성을 제거하기 위하여 투명대를 pronase (0.1%) 용액으로 처리하여 제거한 후 24시간동안 virus를 생산하는 세포와 공동배양을 유도한 다음 각각의 수정란을 10 μ l의 소적내에서 배양한 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같다. 수정후 2일째 (\geq 2-세포기)와 8일째 (상실배기 혹은 배반포기)에 투명대를 제거하지 않은 대조구와 제거구를 비교한 결과 투명대 제거구의 경우 72.0%와 10.4%로서 대조구의 81.3%와 13.8%에 비해 유의차는 인정되지 않았으나 낮은 배발생율을 나타냈다. 따라서 투명대의 유무는 배발달에 있어서 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. Table 1과 2를 비교해서 고찰해 볼때 5 μ g/ml의 polybrene 첨가와 투명대 유무는 수정란의 배발달에 직접적인 영향을 미치지 못하나 10 μ l 소적내에 한개씩의 수정란의 배양이 낮은 배발달율의 주된 원인으로 추정되는 바 이와 같은 결과는 Paria와 Dey (1990) 가 보고한 내용과

일치되는 것이라 하겠다.

3. 수정란으로 부터 *E. coli LacZ* 유전자의 발현

총 625개의 투명대 제거 수정란을 virus를 생산하는 세포와 24시간동안 공동배양한 결과 상실배와 배반포 단계까지의 배발생율은 10.4% (65/625) 였으며, 그 중 LacZ+ 를 나타내는 수정란은 12.3% (8/65) 였다 (Table 2 와 Fig. 1). 이러한 결과는 앞선 연구에서 현미경 미세주입법을 통하여 virus를 생산하는 세포를 위관강내 주입했을 때 얻어진 성적 (21.0%) 보다는 낮았다. 이러한 원인은 10 μ l 배양액 소적당 1개씩 수정란을 배양함으로 인한 낮은 배발생율에 기인한 것으로 사료된다. 한편, LacZ+ 수정란의 일부 blastomere에서 LacZ 유전자가 발현되지 않았던 것은 앞서 보고된 연구 결과 (Kim과 Park, 1995)와 유사한 것으로서 이는 본 실험에 사용된 virus의 낮은 감염성으로 말미암아 부분적인 감염때문인 것으로 사료된다. 더불어 몇번의 반복실험 결과 상실배 단계의 수정란에서 전체적인 LacZ 유전자의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1.B).

이상의 결과를 종합하여 고찰하여 보면 Kim과 Park (1995) 이 보고했던 바와 같이 LacZ+ 수정란

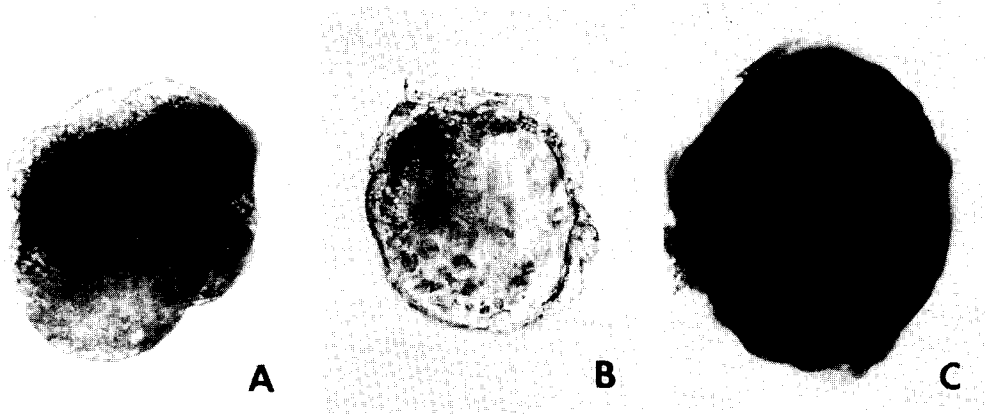


Fig. 1. β -galactosidase detection by X-gal staining.

Blue spots were observed in the cytoplasm of some blastomeres (A), the whole cytoplasm (C) and the ICMs (B).

A. Morula stage ($\times 200$), B. Blastocyst stage ($\times 200$), C. Morula stage ($\times 250$)

은 virus를 생산하는 세포 자체가 염색되어 발견되는 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 최근 Haskell 등 (1995) 에 의해 보고된 retrovirus를 이용한 소 수정란의 gene transfer 가능성을 더 한층 확인하였을 뿐만 아니라 virus를 생산하는 단층배양 세포와 초기단계의 소수정란과의 공동배양을 유도하더라도 수정란으로부터 유전자의 발현이 가능함을 밝혔다는데 커다란 의의가 있다고 하겠다.

IV. 적 요

본 연구는 앞서 보고된 ICM 세포로부터 발현된 *LacZ* 유전자가 현미경 미세주입된 virus를 생산하는 세포의 감염에 의한 것임을 밝히고자 실시하였다. 투명대가 제거된 1-세포기 수정란은 virus를 생산하는 세포와 단 1일간 공동배양된 후 계속해서 6일간 배발생이 유도되었으며, X-gal 염색법을 통해 *E. coli LacZ* 유전자의 발현 유무를 확인하였다.

본 실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 1-세포기 수정란은 polybrene ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 이 첨가된 배양액 (CR1+10% HT-FCS)에서 24시간 동안 배양되더라도 배발달에 아무런 영향을 미치지 않았다.

2. 투명대가 제거된 1-세포기의 수정란을 virus를 생산하는 세포와 공동배양을 실시했던 바, 투명대가 존재하는 수정란에 비해 유의차는 인정되지 않았으나 낮은 배발생율을 나타냈다.
3. 한편, 총 625개의 투명대 제거 수정란 중 상실배와 배반포 단계까지의 배발생율은 10.4% ($65/625$) 였으며, *LacZ* 유전자의 발현율은 12.3% ($8/65$)였다.

V. 인용문헌

1. Doetschman, T., P. Williams and N. Maeda. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Develop. Biol.* 127 : 224-227.
2. Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Roddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by micro injection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 7380-7384.
3. Haskell, R. E. and R. A. Bowen. 1995. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Rep-*

- rod. and Develop. 40 : 386-390.
4. Jaenisch, R., F. Hung and B. Croker. 1975. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus : Tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 4008-4012.
 5. Kim, T., M. L. Leibfried-Rutledge and N. L. First. 1993. Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon ape leukemia virus envelopes. Mol. Reprod. and Develop. 35 : 105-113.
 6. Kim, T. and S. P. Park. 1995. Expression of *E. coli LacZ* Gene in Bovine Morulae or Blastocysts after Microinjection of Retrovirus Vector-Producing Cells into the Perivitelline Space of One- to Four-Cell Embryos. Kor. J. Anim. Reprod. ----- ?
 7. Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 8424-8428.
 8. Notarianni, E., C. Galli, S. Laurie, R. M. Moor and M. J. Evans. 1991. Derivation of pluripotent embryonic cell lines from the pig and sheep. J. Reprod. Fert. Suppl. 43 : 255-260.
 9. Notarianni, E., S. Laurie, R. M. Moor and M. J. Evans. 1990. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. J. Reprod. Fert. Suppl. 41 : 51-56.
 10. Paria, B. C. and S. K. Dey. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro* : Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 4756-4760.
 11. Rosenkrans, C. F. and N. L. First. 1991. Culture of bovine zygote to the blastocyst stage effect on amino acids and vitamins. Theriogenology. 35 : 266 (abstract).
 12. Rosenkrans, C. F., G. Q. Zeng, G. T. McNamara, P. K. Schoff and N. L. First. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Reprod. 49 : 459-462.
 13. Sims, M. M. and N. L. First. 1994. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 6143-6147.
 14. Stewart, C. L., S. Schuetze, M. Vanek and E. E. Wagner. 1987. Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. J. Embryology. 6 : 383-388.