

## 리포솜을 이용한 형질전환 닭 생산에 대한 연구

변승준<sup>1</sup> · 박철<sup>1,3</sup> · 양보석<sup>1</sup> · 김태운<sup>2</sup> · 손시환<sup>3</sup> · 김상훈<sup>4</sup> · 전익수<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>축산연구소 응용생명공학과, <sup>2</sup>가톨릭대학교 의과대학, <sup>3</sup>진주산업대학교 동물생명과학과, <sup>4</sup>경희대학교 생물학과

### A Study of the Liposome-Mediated Transgenic Chicken Production

S. J. Byun<sup>1</sup>, C. Park<sup>1,3</sup>, B. S. Yang<sup>1</sup>, T. Y. Kim<sup>2</sup>, S. H. Sohn<sup>3</sup>, S. H. Kim<sup>4</sup> and I. S. Jeon<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Livestock Research Institute, Biotechnology Division, 564 Omokchun-Dong, Suwon, Gyeonggi 441-350, South Korea,

<sup>2</sup>The Catholic University of Korea, 90-2 Heawha-Dong 16-1 Dongsomun-Ro, Jongro-Gu, Seoul 110-758, South Korea,

<sup>3</sup>Department of Animal Biotechnology, Jinju National University, 150 Chilam-Dong, Jinju, Gyeongnam 660-758, South Korea,

<sup>4</sup>Department of Biology, Kyung Hee University, 1 Hoegi-Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul 130-701, South Korea

**ABSTRACT** Microinjection of DNA is a general method for generating transgenic animals, but the rate of transgenesis in chickens is very low. So it was carried out to investigate the efficiency of liposome-mediated gene transfer in stage one cell of chicken embryo with GFP expression vector. In order to determine efficiency and duration of the introduced foreign gene, it was microinjected DNA with liposome or naked DNA into the germinal disc of stage one cell or stage-X chicken embryo. Analysis of reporter gene expression in day-4 embryos showed that GFP expression was observed only in the liposome-mediate embryo groups and detectable up to day-8 embryos. The results suggest that stable integration of the introduced gene using liposome is a rare event. Nevertheless the liposome-mediated gene transfer may be a useful method to transfer a foreign gene into the stage one cell of chicken embryos.

(Key word : liposome, microinjection, GFP, chicken embryo)

## 서 론

닭은 포유류 가축들에 비해 생애동안에 산자수가 많고, 세대간격이 짧으며, 계란을 생산한다는 특성을 가진다. 최근 사회가 발달하면서 의료 및 산업용 인체 유용물질의 요구가 증대되고 더불어 유용물질생산의 중요성이 크게 높아지고 있다. 이러한 상황에서 닭은 계란을 이용한 유용물질 생산의 bioreactor 모델동물로서의 훌륭한 가치를 가진다. 조류의 형질전환 방법은 유전자 운반체로서 바이러스(Harvey et al., 2002) 또는 원시생식세포(primitive germ cell)를 이용하는 방법(Petite et al., 1990)과 외래 유전자를 1세포기 수정란에 직접 미세 주입하는 방법(Love et al., 1994)이 개발되어 있다. 닭의 수정란은 포유류와 달리 다량의 난황을 함유하고 있어 수정란을 다루기가 몹시 어렵고, 배자 내에 있는 핵은 현미경을 이용한 육안 관찰이 불가능한 특성으로 인해 실험동물

인 생쥐와 같은 효율적인 형질전환 방법이 수립되어 있지 않다. 최근 여러 연구보고들(Kwon et al., 2004; McGrew et al., 2004)에서 배반엽 단계(stage-X)에 virus를 이용하여 형질전환 닭을 생산한 보고들이 있다. 하지만 이 방법으로 제조된 형질전환 닭의 G0 형질전환체가 100% 모자이크이므로 완전한 형질전환 닭을 생산하기 위해서는 수천 마리의 닭을 후대검정하여 확인을 해야 하는 문제점이 있다. 본 실험은 모자이크가 나타날 확률이 현저히 낮으며, 외래 주입유전자가 성세포에 도입될 확률이 높은 1 세포기 수정란 단계에서 외래 유전자를 효율적으로 핵 내로 전이시키기 위해서 리포솜을 사용하는 방법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

이 논문은 농촌진흥청 Biogreen 21 사업비 지원에 의해 수행되었음.

† To whom correspondence should be addressed : jeonis@rda.go.kr

## 1. 공시동물

본 실험에 사용한 실험동물과 수정란은 축산연구소에서 보유중인 갈색 산란 실용계와 동종이 산란한 수정란을 사용하였다. 공시동물의 사육실은 외부공기를 Pre-filter와 Medium filter로 2중 여과를 시켜서 사육실 내부로 공급하여 청정도(진집효율 99% 이상)를 유지하였다. 실내온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지시키고, 16시간 고정점등하였다. 물과 사료는 무제한 급여하면서 케이지에 사육하였다.

## 2. 1세포기 닭 수정란의 채란

1세포기 수정란을 제공하기 위한 공여계(donor hen)를 얻기 위해, 클러치당 5개 이상 산란하는 개체 135수를 선발하고 채란 이틀 전 동일계통의 수탉 정액을 이용하여 공여계에 인공수정하였다. 채란 당일 산란 후 2시간 15분 후에 공여계를 도살하여 복부로부터 1세포기 수정란이 들어 있는 난백분부에서 협부까지의 난관을 절제한 다음, 협부와 수정란까지의 길이를 측정한 뒤 난관을 벗겨내고 1세포기 수정란을 채란하였다.

## 3. 1세포기 수정란의 체외배양

1세포기 수정란의 체외배양은 페리와 마더(Perry and Mather, 1991)의 방법을 약간 수정한 전익수(2000)가 고안한 방법에 의해서 수행하였다. 1세포기 수정란의 체외배양을 위한 배양 용기로는 공여계가 도살되기 전에 산란한 알의 무게와 동일한 신선란을 선별하여 예단부를 직경 3.5 cm로 자른 대리난각을 사용하였다. 1차 배양에 사용한 배양액은 신선란에서 수양성 난백을 채취한 후,  $\text{CO}_2$  가스로 버퍼링(buffering)하고 pH 7.30~7.35로 조절하여 사용하였다. 이와 같이 준비된 배양액 5 mL를 대리난각에 채운 후, 채란된 1세포기 수정란을 이식하였다. 이식 후 1회용 배양접시로 대리난각의 입구를 덮고  $41.5^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 습도가 포화상태의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 2차 배양을 위한 배양액은 배양 1일 전에 신선란에서 수양성 난백을 채취한 후, 버퍼링하지 않고  $37.6^\circ\text{C}$ 까지 가온시켜 사용하였다. 1차 배양이 끝난 후 준비된 배양액을 이용하여 대리난각을 완전히 채운 후, 랩(wrap)으로 밀봉하고 온도  $37.6^\circ\text{C}$ , 습도 65~70%의 배양기에서 11분마다  $90^\circ$ 씩 전란시키면서 3일간 2차 배양하였다. 3일간의 2차 배양이 끝난 후에는 배양용기를 공여계가 도살되기 전에 산란한 알의 무게보다 약 25g 무거운

신선란을 선별하여 직경 4 cm로 단단부를 자른 대리난각으로 교체하였다. 준비된 대리난각으로 수정란과 내용물을 옮긴 후 랩으로 밀봉하고, 온도  $37.6^\circ\text{C}$ , 습도 65~70%의 배양기에서 30분마다  $30^\circ$ 씩 전란시키면서 15일간 배양하였다. 부화까지는 전란없이 3차 배양하였다.

## 4. 배반엽단계(Stage-X) 수정란의 체외배양

배반엽단계 수정란은 인공수정된 공여계가 체외로 배출한 수정란들을 이용하였다. 배반엽단계 수정란의 배양과정은 수정란이 닭의 체 내에 머무르는 동안 이미 수정란의 배 발달이 진행되었으므로 1차 배양의 과정없이 바로 3일간 2차 배양을 진행하였다. 나머지 조건들은 1세포기 수정란의 배양 과정과 동일하게 진행하였다.

## 5. 유전자 미세주입

리포솜과 GFP 발현 벡터는 각각 상업적으로 가용한 lipofectin과 lipofectamine2000 제품(Invitrogen, Carlsbad, CA)<sup>1</sup>과 linear 형태의 pEGFP-N1(BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA)<sup>2</sup>을 사용하였다. 모든 실험은 특별한 언급이 없는 경우 리포솜은 lipofectamine2000을 사용하였다. 유전자 미세주입 방법은 Love 등(1994)이 제시한 방법을 이용하였다.

### 1) 배반엽단계 수정란에 외래유전자 도입

배반엽단계 수정란에서 최적의 리포솜과 유전자의 농도를 확립하고자, 각각 리포솜( $100 \sim 400 \mu\text{g/mL}$ )과 유전자( $25 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ )의 농도를 달리한 2,000 nL의 혼합물들을 수정란의 세포질에 주입하였고, 대조군은 동일량의 GFP 발현 벡터만을 주입하였다. 수정란의 생존율은 배양 3일차까지 생존하고 있는 배자의 수이며, GFP 발현율은 배자의 생존에 관계없이 배양 3일차에서 GFP 발현을 하는 배자들을 모두 포함하였다.

### 2) 1세포기 수정란에 외래유전자 도입

$25 \mu\text{g/mL}$ 의 GFP 발현 벡터와  $100 \mu\text{g/mL}$  리포솜(lipofectamine2000)을 혼합한 20 nL의 혼합물을 1세포기 수정란의 세포질에 미세 주입하였다. 배자의 생존율과 발현율은 배양 4일차 배자에서 앞서 언급한 방법과 동일한 방법으로 조사하였다.

<sup>1</sup> Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, USA.

<sup>2</sup> Bioscience Clontech, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA.

## 6. 통계분석

모든 얻어진 실험결과들의 통계분석은 Statistical Analysis System(SAS Institute, 1996)을 이용하였다. 두 처리간의 유의성 검정은 t-test로 분석하였고, 농도에 따른 요인실험은 GLM procedure로 분산분석을 실시하였으며, 처리간의 유의성 검정은 Tukey의 다중 검정을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배반엽단계 수정란에 외래유전자 도입

연구의 최종 목표인 리포솜을 이용한 1세포기 수정란에서 유전자 미세주입 적용에 앞서, 최적의 실험 조건들을 확립하고자 1세포기 수정란에 비해 비교적 배양이 쉬운 배반엽단계의 수정란에서 유전자 농도, 리포솜 농도, 그리고 리포솜의 종류에 따른 수정란의 생존율 및 GFP 발현율을 조사하였다. 먼저 리포솜이 배반엽단계 수정란에서 외래유전자의 핵전이 능력이 있음을 확인하고자 하였다. 기존의 잘 알려진 내용들을 고려하여 유전자의 농도는 Love et al.(1994)이 제시한 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 따랐으며, 리포솜의 농도는 *in vitro*에서 잘 알려진 내용인 DNA와 리포솜의 농도가 1:4의 비율에서 맞추어 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  그리고 유전자 주입량은 배반엽단계 수정란에서 virus 주입량을 고려하여 2,000 nL로 결정하였다. 실험은 리포솜이 혼합한 실험군과 그렇지 않은 대조군으로 나누고, 각각 수정란의 세포질에 2,000 nL의 유전자를 주입하였다. 수정란의 생존율은 배양 3일차까지 양쪽 그룹에서 비슷하였으나, GFP 발현율은 극명하게 대조적인 결과를 나타내었다(Table 1). Fig. 1은 배양 3일차 수정란에서 GFP 발현 양상을 보여주고 있다.

배반엽단계 수정란에서 최적의 유전자와 리포솜의 농도를 확립하고자 주입유전자의 농도를 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 고정하

**Table 1.** Effect of liposome on the foreign gene expression at day 3 chicken embryo

	DNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Liposome ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Injection volume(nL)	Embryo survival rate <sup>1</sup>	GFP expression rate <sup>1</sup>
Con	25	0	2000	0.80±0.23	0
Exp	25	100	2000	0.83±0.11	0.50±0.17**

<sup>1</sup> Values are means±SD from three independent experiments consisting of twenty embryos each.

\*\* Values with different superscripts within a column differ significantly( $p<0.01$ ).



(A)



(B)

**Fig. 1.** GFP expression pattern in day-3 embryo. 2000 nL of mixtures of liposome (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and DNA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were microinjected into the germinal disc of blastodermal stage embryo. The embryos were sacrificed at 3 day post-microinjection and examined under a fluorescence inverted microscope. Yellow arrow head shows GFP expression. A: control; B: GFP expression embryo.

고 리포솜의 농도를 100과, 200, 그리고 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 변화를 주었을 때 주입한 외래유전자 핵전이 효율성을 검증하고자 시험하였는 바 그 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 100~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  리포솜 농도 범위 내에서는 배아들의 생존율은 큰 차이를 나타내지 않았으나, GFP 발현 양상은 리포솜의 농도가 증가할수록 다소 감소하는 듯한 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 없는 것을 고려해 볼 때 주입유전자와 리포솜의 농도비는 1 : 4가 적절하다고 판단되었다.

다음은 주입유전자의 농도 변화에 따른 주입유전자의 핵

전이 효율성을 검증하고자 주입유전자의 최고 농도를 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 하고, 유전자와 리포솜 농도비(1:4)를 고려하여 리포솜 농도를 400  $\mu\text{g/mL}$ 으로 고정하여 시험한 결과(Table 3) 25~100  $\mu\text{g/mL}$  범위의 유전자 농도에서 배아의 생존율과 GFP 발현 양상에 별다른 차이를 나타내지 않음을 확인하였다. 따라서 Table 2와 3의 연구결과로부터 유전자 농도 25  $\mu\text{g/mL}$ 과 리포솜 농도 100  $\mu\text{g/mL}$ 가 배반엽단계 수정란에서 최적의 조건임을 확인하였고, 향후 실험들은 확립된 조건하에서 수행하였다. 확립된 조건은 우연하게도 처음 수행한 Table 1의 조건들과 일치하였다.

앞서 언급한 실험들에서 사용한 lipofectamine2000 이외에 상업적으로 판매되고 있는 다른 리포솜인 lipofectin에 대하여 외래유전자 핵전이 효율성과 수정란의 생존에 미치는 영향들을 조사해 본 결과(Table 4) 핵전이 효율성과 수정란의 생존율에 있어서 두 제품 상호간의 특이적인 차이를 확인

**Table 2.** Effect of liposome concentration on gene transfection

	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	liposome ( $\mu\text{g/mL}$ )	Injection volume (nL)	Embryo survival rate <sup>1</sup>	GFP expression rate <sup>1</sup>
Con	25	0	2000	0.93±0.06	0 <sup>b</sup>
Exp 1	25	100	2000	0.83±0.06	0.57±0.06 <sup>a</sup>
Exp 2	25	200	2000	0.90±0.10	0.50±0.10 <sup>a</sup>
Exp 3	25	400	2000	0.87±0.06	0.43±0.06 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means±SD from three independent experiments consisting of twenty embryos each.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within a column differ significantly( $p<0.01$ ).

**Table 3.** Effect of DNA concentration on gene transfection

	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Liposome ( $\mu\text{g/mL}$ )	Injection volume (nL)	Embryo survival rate <sup>1</sup>	GFP expression rate <sup>1</sup>
Con	25	0	2000	0.93±0.07	0 ±0.00 <sup>b</sup>
Exp 1	25	400	2000	0.91±0.04	0.49±0.04 <sup>a</sup>
Exp 2	50	400	2000	0.81±0.08	0.47±0.07 <sup>a</sup>
Exp 3	100	400	2000	0.96±0.04	0.49±0.08 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means±SD from three independent experiments consisting of twenty embryos each.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within a column differ significantly( $p<0.01$ ).

할 수 없었다.

2. 1 세포기 수정란에 외래유전자 도입

1세포기 수정란에 유전자 미세주입은 배반엽단계에서 확립된 유전자와 리포솜의 농도 조건으로 수행하였던 바 그 결과를 Table 5에 나타내었다. GFP 발현은 배반엽단계 수정란의 연구결과와 동일하게 리포솜을 사용한 실험군에서 배양 4일차 수정란에서만 관찰되었으며, 생존율에 있어서 각 그룹 간에 큰 유의성을 나타내지 않았다. 더불어 배반엽단계 수정란에서는 GFP 발현이 배아의 몇몇 곳에서만 관찰된 것과는 달리(Fig. 1), 1세포기 수정란에서는 GFP 발현이 배아의 더 넓은 부분에서 관찰되었다(Fig. 2). 연구결과는 리포솜 방법이 naked DNA에 비하여 1세포기 수정란에서 대략 80%의 효율로 외래 유전자를 핵내로 도입할 수 있음을 GFP 발현으로 보여주고 있다. 또한 주입된 외래 유전자에 의해 만들어진 GFP 단백질이 배자에서 일주일 정도 지속적으로 발현됨을 관찰하였으나, 이후 생산된 후대들의 유전분석에서 긍정적인 결과들을 확인하지 못하였다.

**Table 4.** Comparison of transfection efficiency of the lipofectin and lipofectamine2000 in blastodermal stage embryo

	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Liposome ( $\mu\text{g/mL}$ )	Injection volume (nL)	Embryo survival rate <sup>1</sup>	GFP expression rate <sup>1</sup>
lipofectin	25	100	2000	0.97±0.05	0.54±0.09
lipofectamine 2000	25	100	2000	0.94±0.09	0.50±0.04

<sup>1</sup> Values are means±SD from three independent experiments consisting of 15 embryos each.

<sup>1</sup> There is no significant difference between treatments.

**Table 5.** Effect of liposome on the foreign gene expression at day 4 chicken embryo

	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Liposome ( $\mu\text{g/mL}$ )	Injection volume (nL)	Embryo survival rate <sup>1,2</sup>	GFP expression rate <sup>1</sup>
Con	25	0	20	0.48±0.09	0
Exp	25	100	20	0.49±0.11	0.83±0.12**

<sup>1</sup> Values are means±SD from six independent experiments consisting of 30 embryos each.

\*\* Values with different superscripts within columns differ significantly( $p<0.01$ ).



(A)



(B)

**Fig. 2.** GFP expression pattern in day-4 embryo. 20 nL of mixtures of liposome(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and DNA(25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were microinjected into the germinal disc of one cell embryo. The embryos were sacrificed at 4 day post-microinjection and examined under a fluorescence inverted microscope. A: control; B: GFP expression embryo.

리포솜을 이용한 1세포기 수정란 연구결과들은 앞서 닭의 배반엽단계에서 리포솜을 이용하여 실험한 연구결과(Rosenblum, 1995)와 매우 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 리포솜은 닭의 배반엽단계와 1세포기 수정란 모두에서 효율적으로 외래유전자를 핵으로 전이시키는 능력은 가지나 주입된 유전자의 염색체내의 삽입에 큰 영향이 없으므로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 기존의 형질전환 닭 생산방법 중의 하나인 1세포기 수정란에 유전자를 직접 주입하는 유전자 미세주입방법을 개선할 목적으로 리포솜과 외래 표지 발현유전자인 GFP를 사용하여 외래유전자의 핵전이 효율성과 주입된 외래 유전자의 발현의 지속성을 닭의 배자에서 검증하고자 시도하였다. 외래유전자는 배반엽 단계 혹은 1세포기 수정란의 세포질에 리포솜과 유전자의 혼합물 혹은 오직 유전자만을 미세주입을 하였다. 연구 결과들은 리포솜을 사용한 경우 naked DNA에 비하여 배반엽 단계와 1세포기 수정란 모두에서 효율적으로 외래 유전자를 핵내로 도입할 수 있음을 배양 3과 4일차 닭의 배자에서 GFP 발현 양상을 통하여 확인하였다. 또한 주입된 외래 유전자에 의해 만들어진 GFP는 배자에서 일주일 정도 지속적으로 발현됨이 관찰되었다.

리포솜 방법은 naked 유전자 주입 방법에 비해 1세포기와 배반엽 단계 수정란 모두에서 효율적으로 외래 유전자를 핵내로 이동시키는 능력을 가지나, 주입된 유전자의 염색체 삽입에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 따라서 닭의 수정란에서 리포솜 방법은 외래유전자 도입에 유용한 수단으로 이용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

(색인어: 리포솜, 미세주입 방법, GFP, 수정란)

## 인용문헌

- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R 2002 Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat biotechnol* 19:396-399.
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee CH, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T 2004 Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 320:442-8.
- Love J, Gribbin C, Mather C, Sang H 1994 Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12:60-63.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H 2004 Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5(7):728-33.
- Perry MM, Mather CM 1991 In *Avian incubation*, Butterworth-Heinemann Ltd. London, U.K., p.91.
- Petitte JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ 1990 Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*

108(1):185-9.

Rosenblum CI, Chen HY 1995 In ovo transfection of chicken embryos using cationic liposomes. *Transgenic Res* 4:192-8.  
Statistical Analysis System 1996 SAS user's guide. Statistical

Analysis System Institute Cary NC USA.

전익수 2000 1세포기 닭 수정란 체외배양과 대리난각 배양 기술의 개선. *J Anim Sci & technol* 42(6):777-786.