



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

닭 정자를 벡터로 이용한 형질전환
닭 생산에 관한 연구

濟州大學校 大學院

生命工學科

康龍俊

2010年 8月

닭 정자를 벡터로 이용한 형질전환 닭 생산에 관한 연구

指導教授 鄭棟基

康龍俊

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2010년 8월

康龍俊의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (인)

委員 _____ (인)

委員 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2010年 8月

**Production of transgenic chicken
using the sperm vector.**

Yong-Jun Kang

(Supervised by professor Dong-Kee Jeong)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF MASTER OF NATURAL SCIENCES

2010. 8.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

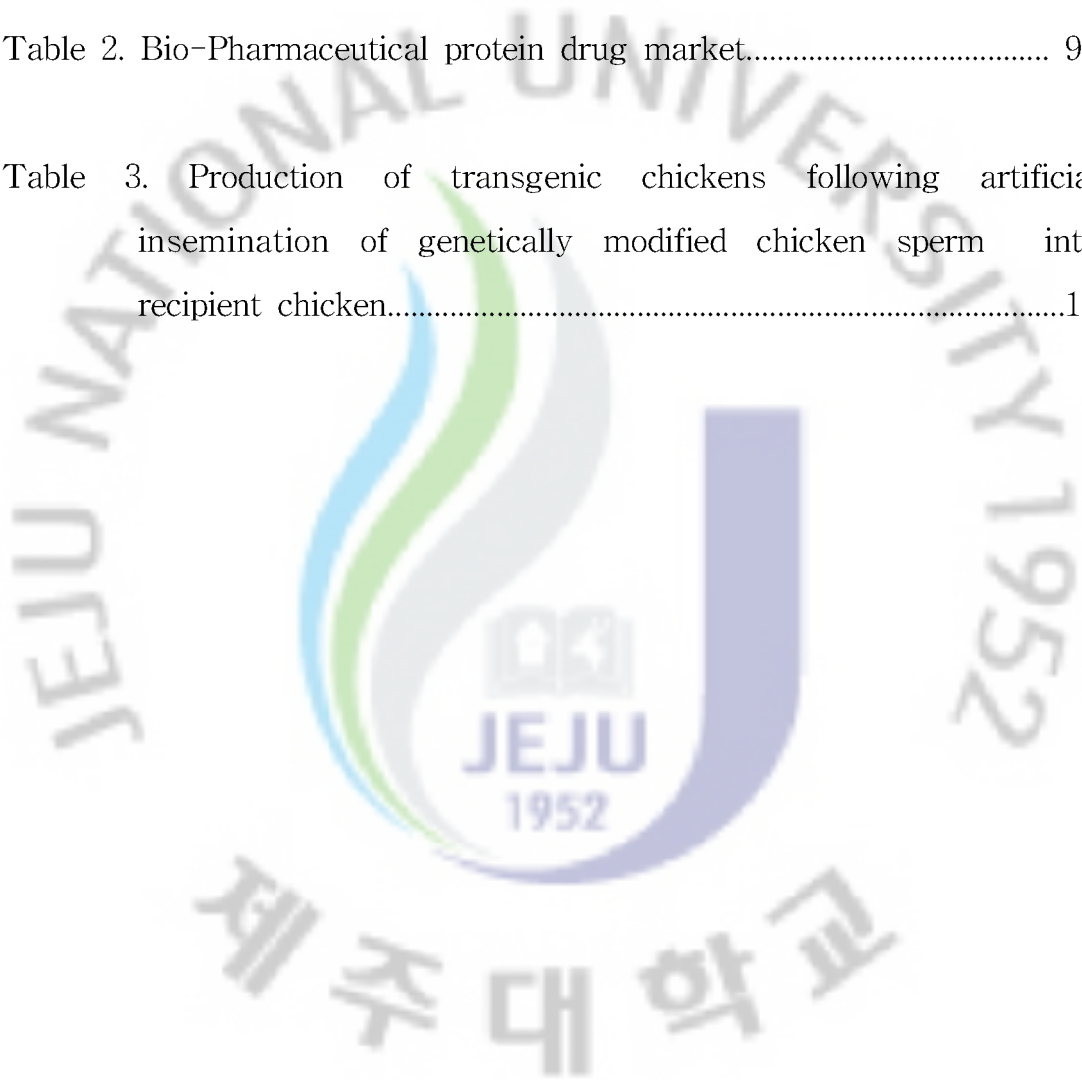
I. 서 론	1
II. 연구사	3
III. 재료 및 방법	10
IV. 결 과	15
V. 고 찰	23
VI. 요 약	26
ABSTRACT	27
참고문헌	29

The list of figure

Fig. 1. Structure of pG-ENG- I vector.	11
Fig. 2. PCR amplification of DNA extracted from pG-ENG- I after ligation.	15
Fig. 3. Expression of RFP gene in the chicken sperm head.	16
Fig. 4. PCR amplification of DNA extracted from transgenic chicken sperm to detect RFP gene.	17
Fig. 5. Expression of RFP and GFP gene in the late stage embryos.	19
Fig. 6. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect W chromosome DNA.	20
Fig. 7. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect GFP DNA.	21
Fig. 8. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect RFP DNA and hBMP-2.....	22

The list of table

Table 1. Bio-Pharmaceutical protein(2002, Sales Rank).....	8
Table 2. Bio-Pharmaceutical protein drug market.....	9
Table 3. Production of transgenic chickens following artificial insemination of genetically modified chicken sperm into recipient chicken.....	18



1. 서 론

동물유전 분야에서 동물생산성(증체량, 산유량, 산란율)을 개선시키기 위해서 우량품종의 선발 및 육종, 사양관리기술을 발전시켜왔다. 특히, 인공수정기술의 발달로 우량종의 정액을 이용하여 생산성이 높은 동물의 빠르게 증식시킬 수 있었다. 이 기술의 발달로 지금의 축산업이 존재 하고 있는지도 모르겠다. 그러나 품종간의 유전적 조합으로는 생산 효율이 어느 수준에 도달하게 되면 포화 수준에 이르게 되어 최초로 가지고 있던 우리의 성과를 기대할 수 없게 되었다. 이런 전통적인 방법의 한계를 극복하기 위해서 선진국에서는 1970년대부터 수정란 이식, 핵이식, 성감별, 수정란 동결 등의 여러 가지 기술을 시도해 오고 있다(김, 2008).

형질전환 동물이란 인위적으로 외래 유전자를 주입하여 본래의 유전형질 이외의 외래유전자 형질을 함유한 동물을 말하는 것으로서, 즉 전통적인 교배 방법이 아닌 재조합 DNA 기술과 생식세포공학적 방법에 의하여 새로운 유전 형질을 얻게 된 동물을 말한다. 쉽게 다시 말하자면 A라는 동물의 유전자에는 (a)가 있는데 B라는 동물에는 (a)라는 유전자가 없을 때 재조합 DNA 기술과 생식세포공학적 방법에 의해 B 동물에게 전달하여 (a) 유전자가 B 동물에 나타날 수 있게 되는 것을 말한다.

이러한 동물을 생산하기 위해서는 일단 필요한 유전자의 정보를 확보하고 이들을 효율적으로 발현시키는 유전자 재조합기술과 수정란 조작기술 그리고 동물 번식 생리 및 생물학적 지식 등의 기반지식이 뒷받침 되어야 한다. 이 방법으로 생산된 형질전환동물로부터 의약품 단백질을 대량 생산하거나 동물 자체의 유전자형을 변형시킴으로써 생산성의 증가와 경제성을 가지게 할 수 있는데 여기서 우리가 왜 형질전환동물을 생산하려고 하는가에 대한 궁극적인 목표를 발견 할 수 있다. 최근 급속한 발달로 인해 많은 질병이 발병되고 있어 인체 유용물질들의 수요가 급속하게 증가되고 있는 실정이다(김, 2008).

그래서 지금까지는 대장균 등의 미생물과 동물세포 배양을 통해 인체 유용 단백질을 생산하고 있는데 여러 가지 문제들로 인해 값이 매우 비싸다. 하지만 닭

을 이용하는 경우에는 짧은 세대 간격과 저렴한 사육비용 그리고 계란으로 생산되므로 대량생산이 가능하다(Ivarie, 2003; Lillico 등, 2005). 또한 계란에 포함된 단백질이 우유 단백질보다 적기 때문에 재조합 단백질의 정제 비용이 싸다. 그리고 계란에서 생산된 재조합 단백질은 다른 포유동물에서 생산된 재조합 단백질보다 단백질의 당화(glycosylation)양상이 더 유사한 보고도 있다(Raju 등, 2000).

최근 여러 연구 그룹(Kwon 등 2004; McGrew 등, 2004)에서 바이러스를 이용하여 형질 전환 닭을 생산한 보고들이 있다. 하지만 바이러스 자체가 병원성을 가지고 있기 때문에 아직까지도 검증 단계에 있다. 그래서 본 연구는 정자를 매개로 한 형질전환 닭의 생산을 위한 기초적인 실험으로 수행하였다.



II. 연구사

1. 형질전환 닭을 생산하는 기법

형질전환 가금을 생산하기 위한 외래 유전자의 전이방법에는 lentivirus vector를 사용하는 방법(McGrew 등, 2004), retrovirus vector를 사용하는 방법(Harvey 등, 2002; Kamihira 등, 2005; Koo 등, 2006), 그리고 분리한 PGC세포에 virus를 이용한 유전자 전이를 실시하여 다시 배아로 주입하는 방법(Park 등, 2003; van de Lavoie 등, 2006) 등이 있는데 가금류는 포유동물과 달리 초기 배아의 발생학적, 형태학적 특이성 때문에 포유동물의 방법으로 닭의 배아 생식선 내로 외래 유전자를 도입하는 것은 매우 어렵다. 그 이유는 수정시에 여러 개의 정자가 한꺼번에 수정되어 여러 개의 전핵이 존재 하고, 수정란을 체외에서 다루기가 매우 어렵다. 그리고 조류의 수정란은 수정 후부터 계속 분열하여 stage X의 계란은 이미 60,000개 이상의 세포로 구성되어 형질전환 동물의 생산이 매우 어렵다(Eyal-Giladi 등, 1981).

1) 배반엽 세포의 이용

외래 유전자를 닭의 배아생식세포 내로 직접 미세 주입하는 방법은 가금류의 초기 배아의 발생학적, 형태학적 특이성 때문에 매우 어렵다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 stage X의 배반엽 세포를 이용하여 카이메라를 생산하는 방법이 실시되고 있다. Eyal-Giladi 등(1981)은 40,000-60,000개로 이루어진 배반엽 세포는 다능하고, 이식된 조직이나 세포를 받아들일 수 있다고 하고 있다. 따라서 이 방법은 stage X 세포를 분리하여 우리가 원하는 외래 유전자를 도입시켜 같은 배 발달 단계의 배자에 주입하여 다음 세대에서 외래 유전자가 발현되는가를 확인하여 배아생식세포 카이메라를 생산하는 방법이다(Etches 등, 1996).

그러나 이 방법은 다능한 배반엽 세포를 사용하므로써 외래 유전자를 도입하는 과정에서 섬유아세포(fibroblast)로 변하기가 쉽고, 그 효율이 매우 낮다는 단점이 있다(김, 2008).

2) 대리난각 수정란의 이용

Sang 와 Perry(1989) 난관의 협부(magnum)로부터 수거된 수정 후 1세포 상태의 수정란의 *in vitro* 배양체계가 성공하므로써 1세포 상태의 수정란의 세포질에 외래유전자를 직접 미세 주입하는 방법이 시도되고 있다. 이 방법은 닭의 난관 협부로부터 1세포 단계의 수정란을 얻은 후, geminal disc의 중심부에 원하는 외래 유전자를 미세 주입시키는 방법이다. Sang과 Perry(1989)는 Rous sarcoma virus로 조절되는 CAT 유전자를 geminal disc에 미세 주입시킨 후, 24시간 동안 배양시킨 결과 20배 정도의 DNA량을 관찰하였으나, 배발달 과정 중에서 DNA가 점점 사라지는 것을 관찰하였다. 이는 외래 유전자가 염색체 내로 완전하게 삽입되지 않았음을 입증하는 것이다.

Perry 등(1991)은 geminal disc에 외래 유전자인 lac Z 유전자를 전이시킨 결과 lac Z 유전자 발현을 확인할 수 있었으나, 도입된 외래 유전자가 모자이크(mosaic)상태로 조직 내에 분포하였으며, 이는 수정란의 핵이 아닌 세포질에 유전자가 도입되므로써 세포의 분열중 대부분의 DNA가 소실되었기 때문이다. Naito 등(1994b)은 수정란의 geminal disc에 외래유전자를 직접 주입시키는 방법으로 형질전환 닭을 생산할 수는 있으나 외래 유전자를 도입시키는 효율(0.76%, 2/263)이 굉장히 낮다고 말하고 있다.

3) 원시 생식세포의 이용

원시 생식세포(primordial germ cells, PGCs)는 각 생물의 유전적인 정보를 지니며 단일한 세포적 그리고 분자적 기작을 통하여 자손에게 이러한 특징을 전달

할 수 있는 세포라 하고 있다(Han 등, 1994, Ebara and Fujihara, 2000; Han and Jeong, 2002). 가금류에 있어서 성세포의 전구 세포인 원시생식세포는 외배엽에서 발생하고 점차적으로 이동하기 시작하여 내배엽을 경유하여 생식반월에 모이게 된다(Swift, 1914; Ginsburg and Eyal-Giladi, 1986). 이렇게 모인 생식세포는 원시생식세포는 Hamburger-Hamilton stage 13(Hamburger and Hamilton, 1951) 단계에서 조류의 특징인 배자 외 혈관계가 시작되는데 이때 혈관계로 유입된다. 그리고 유입된 원시생식세포는 혈관을 따라 순환하여 생식선으로 이동하며 정소 내에서 정모세포로, 난소에서는 난모세포로 최종적으로 분화하기 시작한다(Kagami 등, 2007). 이러한 특징은 원시 생식세포를 분리하여 외래 유전자를 도입시켜 이를 다시 초기 배자의 혈관에 주입시켜 생식선 카이메라 닭 생산이 가능하게 되었다(정, 2007).

Chang 등(1997)은 원시 생식기에서 분리한 원시 생식세포를 배양하고 이를 다시 수용체의 배자에 주입하여 생식선 카이메라를 생산하는데 성공하였다고 보고된 바 있다. Ven de Lavoie 등(2006)은 원시 생식세포에 β -actin promoter에 조절을 받아 GFP가 발현되도록 설계되어진 외래 유전자를 전기충격법으로 외래 유전자를 전이시킨 후, 외래유전자(β -actin-GFP)를 함유하고 있는 원시생식세포를 미세 주입하는 방법으로 GO 형질 전환체를 생산하였으며, 생산된 후대에서 GFP가 발현됨을 확인 하였다. 그러나 지금까지 일부 연구자를 제외하고는 대부분의 경우 카이메라 닭의 효율은 매우 낮다는 단점을 지니고 있다(정, 2007).

4) 바이러스 벡터를 이용

외래 유전자를 효율적으로 닭의 염색체에 삽입시키기 위한 방법으로 retrovirus 또는 lentivirus를 외래 유전자의 운반체로서 사용하고 있다.

Shumann 등(1986)은 닭의 생식선내에 외래 유전자를 도입시키기 위한 수단으로 retrovirus를 사용하여 형질전환 닭 생산에 성공하였다고 보고 하였고, Harvey 등(2002)은 Cytomegalovirus(CMV) promoter에 조절을 받아 β

-lactamase가 발현되도록 설계되어진 retrovirus를 배반엽 단계의 수정란에 미세 주입하여 정액 및 난백에서 β -lactamase를 함유하는 형질 전환 닭을 생산하는데 성공하였다.

Chapman 등(2005)은 Phosphoglycerol kinase(PGK) promoter에 조절을 받아 GFP가 발현하도록 설계되어진 lentivirus를 이용하여 GFP가 발현하는 형질 전환 개체를 생산 하였다.

이 방법을 사용하면 유전자 전이 효율면에서는 매우 우수하지만, 바이러스 벡터의 기원은 병원성 바이러스이므로 안정성 등 다양한 문제점을 내포하고 있으며(Freeman and Bumstead, 1987), 전달할 수 있는 유전자의 크기에도 제한이 있다고 보고되고 있다(Salter 등, 1987).

5) 정자를 이용하는 방법

형질전환동물 생산을 위한 방법의 하나로 정자를 매개로 한 유전자 전이법이 다수의 연구자에 의하여 보고되었다(Lavitrano 등, 1989; Bachiller 등, 1991; Sato 등, 1994). 이러한 방법은 “sperm vector”로써 외래유전자 도입을 위한 방법으로 잘 알려져 있지만 재현성의 문제점이 제기되었다(Brinster 등, 1989).

Bachiller 등(1991)은 지질인 liposome과 정자를 체외에서 공배양할 경우 외래 유전자가 정자의 두부에는 결합이 가능하나 이들 정자를 이용하여 형질전환 개체 생산에는 성공하지 못하였다고 보고하였다. 그러나 Ogawa 등(1995)은 외래 유전자를 liposome과 in vitro에서 배양하여 liposome/DNA 복합체 형태로 정소 질내에 직접 주입하는 것이 형질전환 효율성을 높일 수 있다고 보고하였다.

지금까지 정자를 이용하여 재조합 유전자 삽입에 성공한 경우는 생쥐(Lavitrano 등, 1989; Bachiller 등, 1991; Maione 등, 1998), 토끼(Brackett 등 1971; Kuznetsov and Kuznetsov, 1995), 돼지(Gandolfi 등, 1989; Sperandio 등, 1996), 닭(Fainsold 등, 1990), 개구리(Kroll and Amaya, 1996), 소(Perez 등, 1991; Sperandio 등, 1996)에서 보고되었다.

2. 유전자 재조합 단백질 의약품

유전자 재조합 기술이란 정보를 담고 있는 유전자를 박테리아 등에 이입하여 인체에서 생리활성을 나타내는 다양한 효소나 호르몬을 합성하도록 하는 기술로서 생체유래 물질의 대량생산을 가능하게 한 핵심적인 기술로 이 기술을 이용하여 인슐린, 성장 호르몬에서 백신에 이르기까지 많은 인체 활성 물질을 생산할 수 있다(한국보건산업진흥원, 2005).

현재 대부분의 생체유래물질들이 유전자재조합기술을 이용하여 생산되고 있으며, 최근에는 이미 개발된 제품의 활성을 증강 시키거나 연장시키기 위한 시도도 활발히 이루어지고 있다(한국보건산업진흥원, 2005).

1) 유전자 재조합 단백질 의약품의 생산

성장호르몬과 같은 단백질 호르몬, 종양괴사 인자, 인터페론, 인슐린, 예방백신, 단클론항체 등을 생산하기 위해서는 유전자 재조합기술, 유용 미생물에 대한 체계적인 지식 및 대량발효기술, 고도의 단백질 관련 지식 및 대량생산 설비와 같은 아주 복잡한 지식이 밀반침 되어야 한다. 최근 형질전환 가축을 이용하여 인체 활성물질을 생산하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 토끼, 돼지, 염소, 양, 소 등 가축을 “생물 반응기(bioreactor)”로 이용하고 있으며 대부분의 유즙과 가금의 난백을 통하여 인체활성 단백질이 발견되는 것이 보고되고 있다(Simons 등, 1987; Buehler 등, 1990; Ebert 등, 1991; Wall 등, 1991; Wright 등, 1991).

2) 유전자 재조합 단백질 의약품 시장 동향

지난 1982년에 유전자 재조합 당뇨병 치료제인 인슐린(Insulin)이 일라이 릴리사와 노보노디스크사에서 개발하여 미 FDA에 의해 승인된 이후 1999년 말까지

93개가 승인되었다(김, 2008).

Table 1. Bio-Pharmaceutical protein(2002, Sales Rank)

상품명	판매사	일반명	용도	판매액 (백만달러)
Procrit	Johnson & Johnson	Epoetin alfa	빈혈치료제	3,400
Intro-A	Schering-Plough	Interferon alfa-2b	항암 및 간염치료제	2,700
Epogen	Amgen	Epoetin alfa	빈혈치료제	2,261
Novolin	Novo-Nordisk	Human Insulin	당뇨병치료제	1,829
Neupogen	Amgen	G-CSF	항암보조제	1,380
Remicade	Johnson & Johnson	Infliximab	크론병/류머티스관절염 치료제	1,300
Rituxan	Genentech	Rituximab	Non-Hodgkin 림프종 치료제	1,163
Humulin	Eli Lilly	Human Insulin	당뇨병 치료제	1,060
합계				15,093

자료 : Ernst&Young, Resilience: Americas Biotechnology Report 2003, Amgen 2002 Annual Report, 2003

2002년에 150억 달러의 시장이 점점 발달되어 2011년에는 5천억달러 이상의 시장으로 발전될 것이라는 예상이 나오고 있다(Datamonitor, "Monoclonal Antibodies Report Part I", 2007).

국내시장 유전자 재조합 단백질 의약품 시장을 보면 지금 현재는 세계시장의 1.1% 수준이지만 소득증대로 인해 국내 시장도 급격히 발전될 것이다.

Table 2. Bio-Pharmaceutical protein drug market(단위 : 억원)

년도	1997	2000	2001	2006	2011
시장규모	1,274	2,750	3,555	13,663	61,800

출처: 산업자원부, Technology Roadmap, 2001

Table 2에서 보는바와 같이 국내에서도 2011년도에는 6조 이상의 시장이 형성 될 것으로 예상되고 있다.



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구에 이용 되어진 실험동물은 제주대학교 부속 동물사육장에서 사육중인 제주토종닭 암, 수 각각 50수, 100수를 이용하여 수탉은 정자 채취용으로 사용되었고, 암탉은 인공수정용으로 사용되었다. 실내온도는 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지 시켰으며, 16시간 점등하고 8시간 소등하였다. 물과 사료를 무제한 급여하면서 독립 케이지에서 사육하였다.

2. 플라스미드 DNA 준비

생물체에서 발현하는 플라스미드 pLHCRW(from another lab)는 CMV 프로모터 조절하에서 적색 형광단백질(RFP)이 발현하게 되는데 이것을 클로닝을 하고 제한효소인 SnaBI(Takara, Japan)을 이용하여 선형으로 만든다. 그 후 Human BMP-2 유전자를 Human BMP-2 primer와 혼합하고 PCR을 이용하여 다량으로 증폭시켰다. T4 Ligase(Invitrogen, USA)와 pLHCRW 벡터와 Human BMP-2 유전자를 4°C 에서 24시간 동안 반응을 시켰다. Human BMP-2 유전자가 pLHCRW 내로 삽입되었는지를 PCR을 이용하여 확인하였다. 완성된 벡터의 모습은 Fig. 1과 같다.

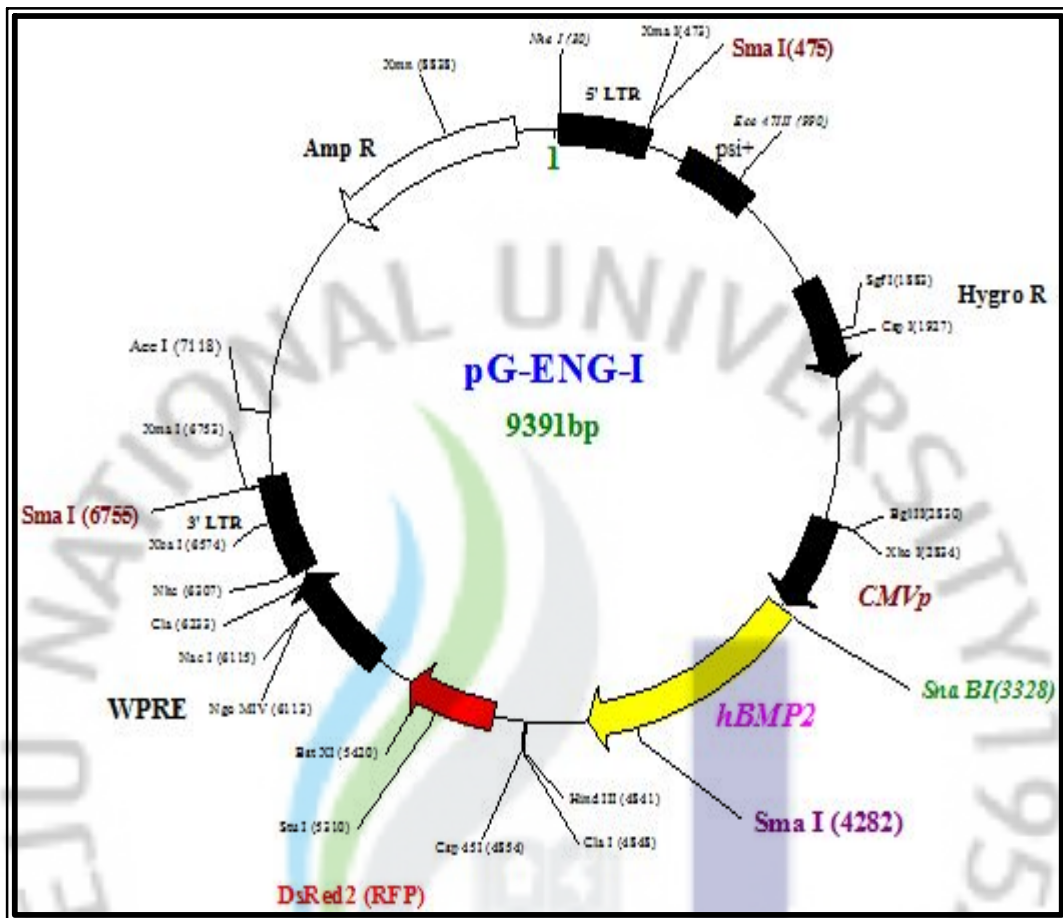


Fig. 1. Structure of pG-ENG- I vector.

3. 닭 정자 추출

닭의 정자 추출은 한번에 5수의 수탉으로부터 복부 마사지 방법을 이용하여 추출하였다(약 1ml 정도). 추출한 닭 정자를 spin down시켜 닭 정자와 섞여있는 찌꺼기를 제거하였고 이렇게 모아진 닭 정자를 4°C, 2000rpm, 10분간 원심분리를 실시하여 정장액과 정자를 완전히 분리시킨 다음 정장액을 완전히 제거하여 다음 실험에 사용되었다.

4. 닭 정자 형질전환과 인공수정

닭 정자의 형질전환은 유전자 전이 장치인 Amaxa Nucleofactor(Amaxa GmbH, Germany)를 이용하여 실시되었다. 이 Amaxa Nucleofactor를 사용하기 위해서 Amaxa Nucleofactor kit를 사용하였다. 0.5ml의 supplement와 2.25ml의 Nucleofactor 용액을 혼합하여 실온에서 미리 가온시킨다. 정장액이 완전히 제거된 정자에 실온에서 미리 가온 시킨 Amaxa Nucleofactor 용액을 $100\mu\text{l}$ 를 넣어 정자를 재부유 시켰다. 그 후 pG-ENG- I (RFP), pmaxGFP(Amaxa GmbH, Germany) 각각 $5\mu\text{l}$ ($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 넣어 Voltex를 이용하여 가볍게 섞어 주고 Amxa 전용 Cuvette에 옮겨 넣었다. 그 다음 Amaxa Nucleofactor 넣고 프로그램 U-23실험을 이용하여 형질 전환 시키고 난 뒤 곧바로 DMEM 배양액 $500\mu\text{l}$ 를 넣어서 재 부유시킨 다음 eppendorf tube에 모두 모은 다음 곧바로 암탉에 인공수정을 시켰다. 그리고 일부는 37°C 에서 배양 시켜 하루 뒤에 형광현미경(Olympus, Japan)하에서 관찰하였다.

5. RNA 추출 및 RT-PCR

형질전환 된 닭의 정자로부터 RNA를 추출하였다. 먼저 DNase를 처리하여 배양액에 남아 있을 DNA를 완전히 제거하였다. RNA는 제조사의 방법에 따라 TRIzol reagent(Invitrogen, Rockville, MD, USA)를 사용하여 분리 하였다. 분리된 total RNA $5\mu\text{g}$ 을 Superscript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 역전사 시킨 cDNA에 Taq polymerase(Takara, Japan), 10X PCR buffer(Takara, Japan), 2.5mM dNTP mixture(Takara, Japan)와 10pM의 RFP primer와 chicken GAPDH 프라이머를 이용하여 중합효소반응으로 증폭시키고 1.2% Agarose gel에서 25분간 전기영동 후, UV를 투과시켜 유전자의 발현여부를 확인하였다.

6. 유정란의 배양

인공수정 실시 3일 후부터 나오는 유정란을 수집하여 부화기(은조 부화기, KE-90)를 이용하여 37°C, 습도는 65% 이상 그리고 2시간마다 90°로 전란 시키면서 배양하였다. 배양 19일째에는 유정란을 37°C의 온도와 습도 75%이상의 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양하였다. 배양하는 동안 3일, 18일 21일째에 유정란의 발생 진행 여부와 부화율을 관찰하였다.

7. 생산된 형질전환 닭의 Genomic DNA 검정

부화한 병아리로부터 채취한 깃털로부터의 genomic DNA의 분리는 Accuprep Genomic DNA extraction kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 DNA를 분리 하였고, 분리된 DNA는 10ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응에 이용하였고, DNA stock은 -20°C에서 보관하였다.

PCR 반응에 사용한 각 primer의 서열은 다음과 같다. RFP(Red Fluorescent Protein)에 해당하는 primer로 forward primer는 5' -GTTCCAGTACGGCTCCAAGG-3', reverse primer는 5' -ATGGTGTAGTCCTCGTTGTG-3'이다. GFP(Green Fluorescent Protein)에 해당하는 primer로 forward primer는 5' -TGATGGGCTACGGCTTCTAC-3', reverse primer는 5' -TCTTGTCGGTGAAGATCACG-3'이다. Chicken GAPDH에 해당하는 primer로 forward primer는 5' -TGATGCCCCATGTTTGTGA-3', reverse primer는 5' -CAAGAAGGGAACACGCAGGG-3'이다. Human BMP-2에 해당하는 primer로 forward primer는 5' -ATCGTGGCCGGCGCTG-3', reverse primer는 5' -CTAGCGACACCCACAACCCT-3'이다. W chromosome marker를 이용하여 병아리의 암, 수를 확인하였다. W chromosome 해당하는 primer로 forward primer는 5' -CCCAAATATAACACGATTCAC-3', reverse primer는

5'-AAATGAATTATTTTCTGGCGAC-3'이다.

각 병아리의 깃털로부터 추출한 genomic DNA 10ng/ μ l는 10pM 각 primer와 Taq polymerase(Takara, Japan), 10X PCR buffer(Takara, Japan), 2.5mM dNTP mixture(Takara, Japan)와 혼합한 후 최종적으로 20 μ l의 PCR 반응액으로 준비되었다. PCR 반응은 초기 변성을 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 40초, 67 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응하는 cycle를 40회 반복 실시한 후 최종신장을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다.



IV. 결과

1. pLHCRW-hBMP-2 벡터의 확인

Human BMP-2 유전자가 pLHCRW 벡터내로 제대로 삽입되었는지를 확인하기 위해 PCR을 이용하여 Human BMP-2 삽입여부를 확인하였다. 확인한 결과 벡터내로 정확히 삽입된 것을 확인할 수 있다(Fig. 2).

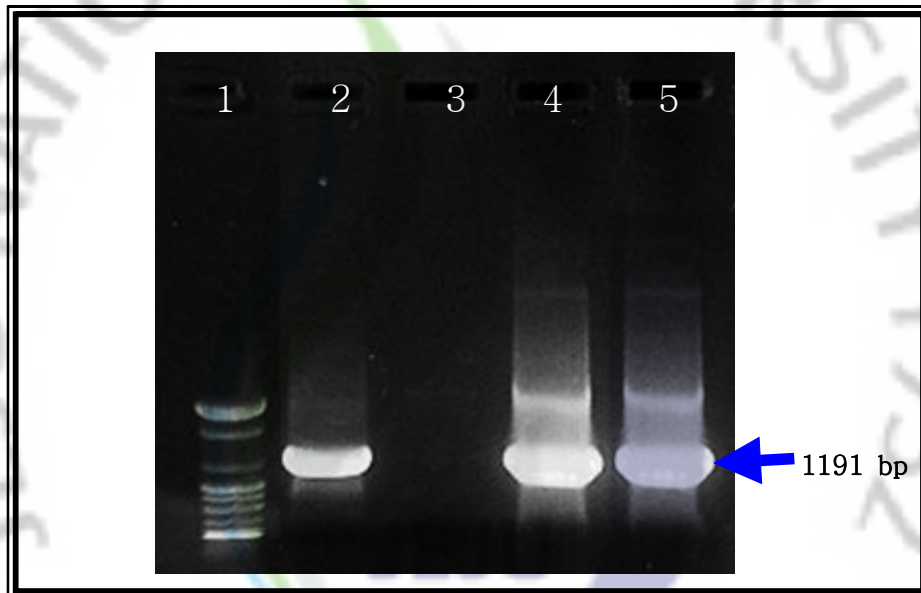


Fig. 2. PCR amplification of DNA extracted from pG-ENG- I after ligation. Line 1 : 100bp Ladder, Line 2 : Positive control(hBMP-2 gene) Line 3 : Negative control(only pLHCRW vector), Line 4, 5 : Samples

2. 닭 정자로의 유전자 전이 확인

닭 정자로 유전자 전이를 확인하기 위해서 유전자가 도입된 정자를 인공수정하기 전에 $10\mu\text{l}$ 를 DMEM 배양액에 37°C 에서 하루 동안 배양을 실시하였다. 배

양을 실시한 결과 닭 정자 머리 부분에서 RFP 형광을 확인 할 수 있었다(Fig 3). 그래서 하루 동안 배양 후 인공수정을 실시하려고 하였으나 닭 정자 배양 방법이 확실히 정립이 되지 않은 상태이고 배양 후에 닭 정자의 운동성과 활성이 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있어 유전자 전이 후 바로 인공수정을 실시하였다.

정자에서 형광을 발현되는 것이 염색체에 삽입이 돼서 발현이 되는 것인지 아니면 염색질에 삽입이 돼서 발현이 되는 것인지를 확인하기 위해서 RNA를 추출 후 RT-PCR을 이용하여 유전자 삽입여부를 확인하였다. 확인한 결과 염색체내에 삽입된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

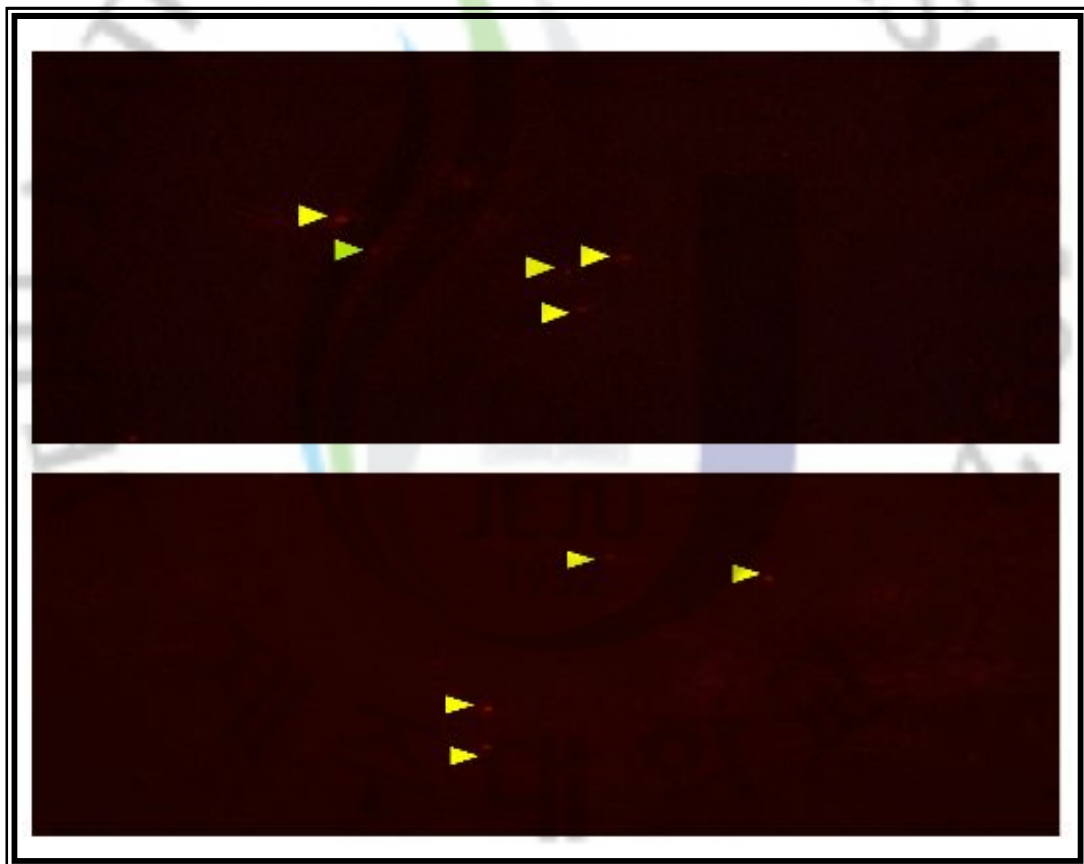


Fig. 3. Expression of RFP gene in the chicken sperm head(Arrow head).

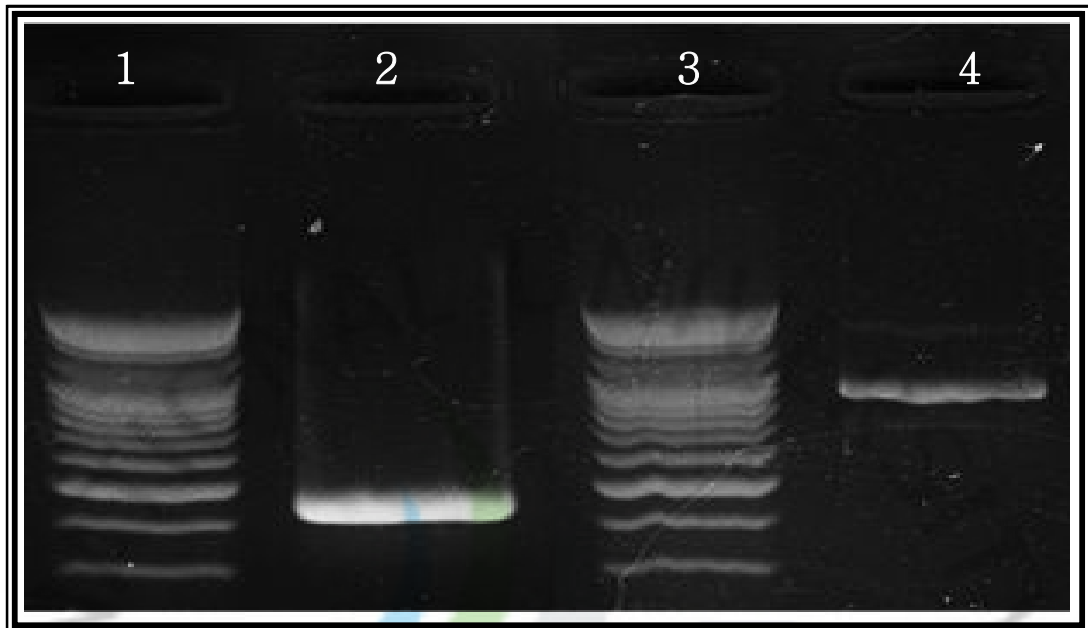


Fig. 4. PCR amplification of DNA extracted from transgenic chicken sperm to detect RFP gene. Line 1, 3 : 100bp Ladder, Line 2 : Sample(sperm), Line 4 : Negative control(Chicken GAPDH)

3. 수정율 확인

인공수정을 실시한 3일 후부터 유정란을 수거하여 부화기에서 부화를 실시하였다. 총 510개의 계란을 수거할 수 있었는데 6일후 검란기로 검란한 결과 99개 (19.4%)만이 유정란으로 판별이 되었고 나머지 411개의 계란은 무정란인 것으로 판별되었다. 이렇게 낮은 수정율을 보인 것은 전기충격에 의한 물리적인 영향이 원인으로 작용한 것으로 보인다. 99개의 유정란 중 30(30.3%)개만이 부화를 하였고, 나머지 69(69.7%)개는 부화하지 못하였다.

Table 3. Production of transgenic chickens following artificial insemination of genetically modify chicken sperm into recipient chicken.

Eggs harvest from hen	Number of 6-day old embryos (% of fertilization)	Number of hatched embryo (% of hatched chicks)	Number of transgenic chicks (% of RFP transgene ratio)	Number of transgenic chicks (% of GFP transgene ratio)	Number of transgenic chicks (% of transgene ratio)
510	99(19.4)	30(30.3)	7(23.3)	12(40)	19(63.3)

발생 중에 죽은 배자를 꺼내어서 형광현미경하에서 RFP 유전자와 GFP 유전자를 확인한 결과 특징적인 한 부분에서만 발현을 하는 것이 아니라 배자 전체적으로 RFP 유전자와 GFP 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

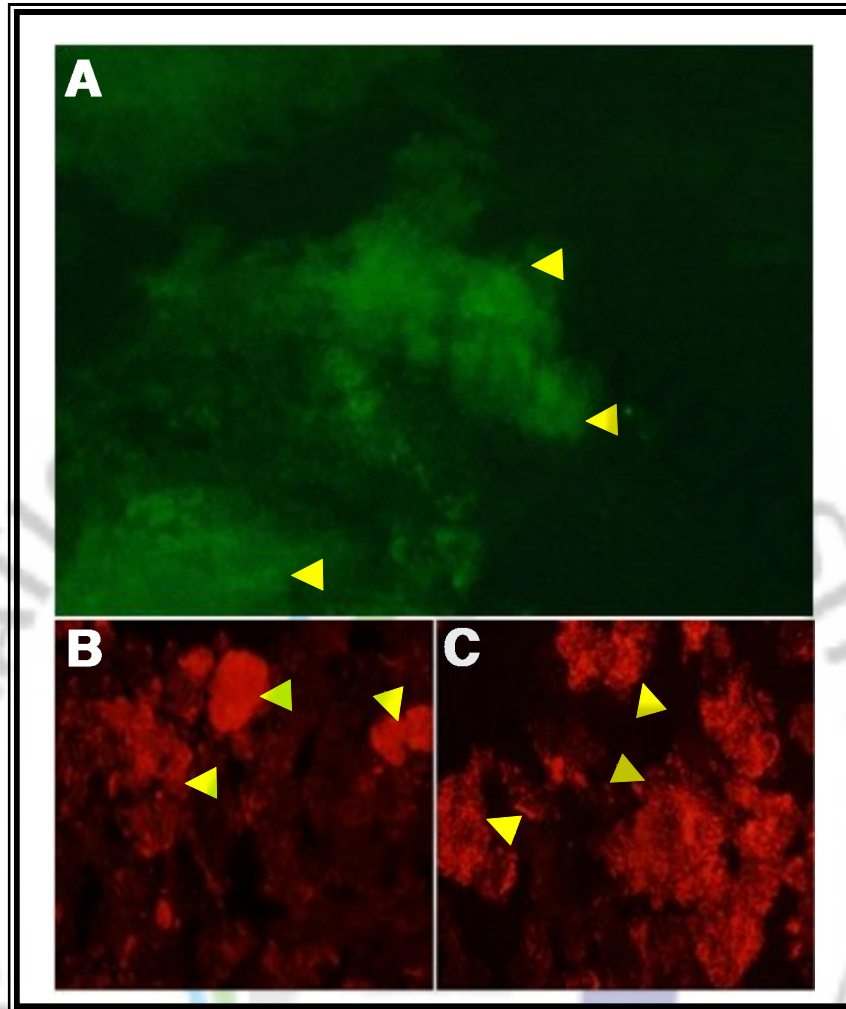


Fig. 5. Expression of RFP and GFP gene in the non-hatched embryos.
(arrow hade)

A : Expression of GFP gene (after 19 days).

B, C : Expression of RFP gene (after 19 days).

3. 형질전환 여부 검정

부화된 30마리의 병아리 깃털로부터 genomic DNA를 추출하고 PCR을 이용하여 형질전환 여부와 암, 수 여부를 검정하였다. 암, 수를 W chromosome marker를 이용하여 확인한 결과 총 30마리의 형질전환 닭 중, 암탉 17마리, 수탉 13마리로 확인되었다(Fig 6).

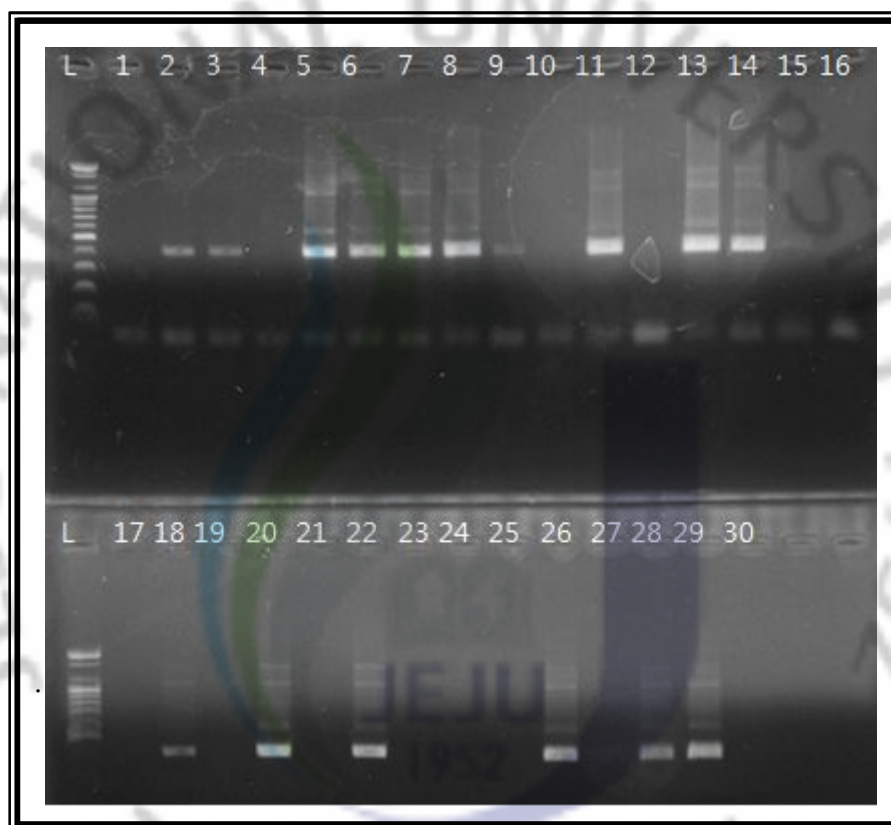


Fig. 6. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect W chromosome DNA.

L : 100bp ladder, Line 1-30 : Transgenic chicken DNA

GFP로 형질전환 시킨 정자에서 부화된 병아리는 수탉 5마리(#4, #23, #24, #25, #30), 암탉 7마리(#3, #11, #14, #19, #21, #22, #26)로 확인이 되었고 이는 40%이라는 높은 형질 전환율을 나타내었다(Table 3, Fig 7).

그리고 RFP-hBMP-2 유전자에 대한 PCR을 실시한 결과, 부화한 30마리 중 수탉 1마리(#1), 암탉 6마리(#2, #5, #6, #7, #8, #15) 총 7마리의 병아리가 형질 전환 개체로 확인되어 약 23.3%의 형질 전환율을 나타내었다(Table 3; Fig 8).

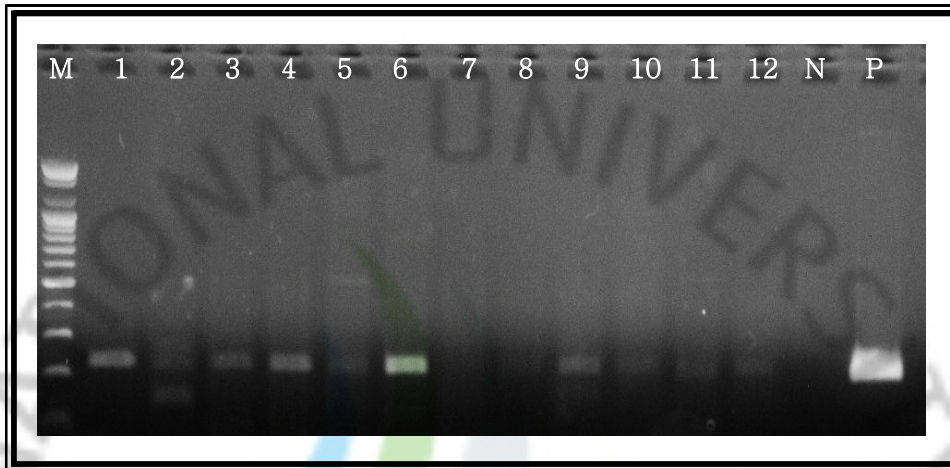


Fig. 7. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect GFP DNA. Lane 1-12:candidate chicken were marked 3,4,11,14,19,21,22,23,24,25,26,30 correlatively, negative control (N), positive control (P).

전체적으로 30마리 병아리 중 19마리 병아리가 형질 전환율을 보여 63.3%의 아주 높은 형질 전환율을 보였다(Table 3).

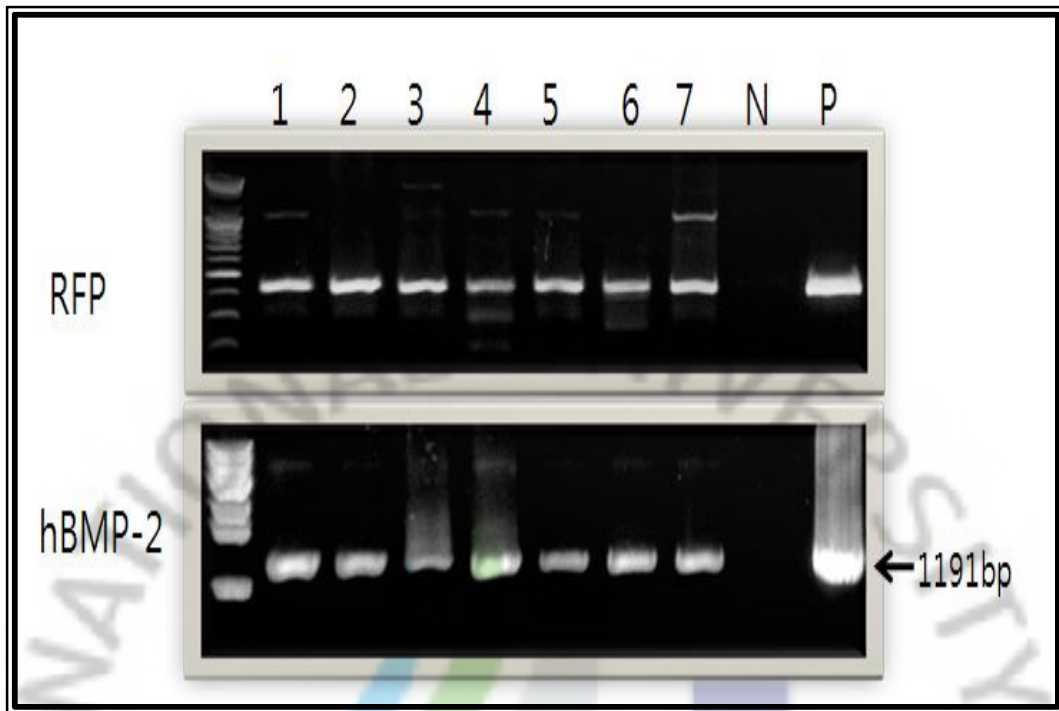


Fig. 8. PCR amplification of DNA genomes extracted from candidate chick feather follicles to detect RFP DNA (upper lane, size marker:100bp) and hBMP-2(down lane, size marker:1kb). Lane 1-7:candidate chicken were marked 1,2,3,5,6,7,8,15 correlatively, negative control (N), positive control (P).

V. 고 찰

지금까지 동물을 생체반응기로 이용한 유전자 재조합 단백질 의약품의 대부분은 소, 돼지, 염소 등의 우유, 뇨 또는 혈액을 통하여 배출되도록 중점을 두어 개발시켜왔다(Houdebine, 2008). 그러나 지금까지 천문학적인 비용이 들어 갔음에도 불구하고 형질전환 가축을 이용한 유전자 재조합 단백질 의약품의 경제적으로 성공한 사례는 많지 않다. 이러한 이유는 포유류의 긴 세대간격과 외래단백질이 체내에서 과잉발현 함으로써 생리적인 부작용을 초래하기 때문이다(김 등, 2008).

이러한 문제를 해결하기 위해서 본 연구에서는 가금류를 선택하였다. 가금류를 선택함으로써 얻어지는 장점은 첫째, 성숙 기간과 세대간격이 짧으며, 둘째, 닭은 하루에 하나씩 알을 생산하므로 포유류 보다 훨씬 높은 번식 능력을 가지고 있어 형질전환 닭의 계통확립에도 용이하다. 셋째, 포유류보다 적은 노력과 적은 비용을 통하여 형질전환 닭을 생산할 수 있고, 많은 개체에 동시에 실험할 수 있다는 장점이 있다(Vick 등, 1993; Han 등, 1994; Naito 등, 1994). 그리고 계란에 포함된 단백질이 포유류에서 생산되는 우유에 비해 적은 수의 단백질을 포함하고 있으므로 정제시 적은 비용으로 유전자 재조합 단백질 의약품을 생산할 수 있다(Raju 등, 2000). 현재까지 형질전환 닭으로부터 생산된 재조합 단백질은 단일 클론 항체(Zhu 등, 2005), single chain Fv-Fc fusion protein(Kamihira 등, 2005), 사람의 EPO(Kodama 등, 2008), 사람의 G-CSF(Kwon 등, 2008) 등의 있으나 경제적으로 생산된 사례는 없다.

본 연구에서는 사람 BMP-2(Bone Morphogenetic Protein 2)를 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다. 뼈와 연골 형성을 유도하는 단백질로 처음 알려진 BMP 단백질은 신경세포를 포함한 다양한 종류의 세포들에서 생물학적인 활성을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 BMP들은 세포증식과 분화, 세포사멸, 신경외배엽의 형성, 중배엽의 형성, 신경계의 분화, 여러 기관의 발달 (정소, 신장, 소화기관, 폐, 치아), 등에 관여 하는 것으로 알려져 있다(Wozney, 1998). 이렇게 다양한 기능을 하는 BMP 유전자 가운데 BMP-2는 조골 아세포의

분화를 촉진시킨다고 보고되고 있으며, 많은 의사들의 정형외과 수술에 사용되고 있다(김 등, 2007). 그래서 본 연구에서는 고가의 생리활성 단백질인 BMP-2를 생산하는 형질전환 닭 생산에 중점을 두고 실험을 수행하였다.

본 연구에 사용된 vector의 구조는 BMP-2 유전자의 발현 조절을 위해 internal promoter인 CMV promoter을 사용하였고, 외래 유전자의 발현을 증가시키기 위해 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 서열을 도입하였다. 그리고 Report gene인 RFP 유전자를 도입시켰고, PCR을 통하여 BMP-2유전자 삽입 여부를 확인 하였다(Fig. 1). 그리고 Chicken oviduct cell에 형질 전환 시켜 확인한 결과 강하게 발현 되는 것을 확인 하였다 (date not shown). 이 결과는 본 연구에서 완성한 vector가 닭에서도 발현 될 수 있음을 확인하였고, 이는 형질전환 닭에서도 BMP-2 단백질을 생산 할 수 있을 것이라 사료된다.

형질전환 가금을 생산하기 위한 외래 유전자의 전이방법에는 lentivirus vector 를 사용하는 방법(McGrew 등,2004), retrovirus vector를 사용하는 방법(Harvey 등, 2002; Kamihira 등, 2005; Koo 등, 2006), 그리고 분리한 PGC세포에 virus를 이용한 유전자 전이를 실시하여 다시 배아로 주입하는 원시생식세포를 이용하는 방법(Park 등, 2003; van de Lavoie 등, 2006)등이 있는데, 이 방법들은 효율이 높지 않았다. 이는 생식선 카이메라 닭이 생산 되었어도 외래 유전자가 염색체 내로 삽입되는 가능성이 매우 낮아 형질 전환 개체를 생산하는 효율이 낮았을 거라 사료 된다. 그리고 지금까지 형질 전환 닭을 생산하는 그룹은 바이러스 벡터를 사용하여 형질전환 닭을 생산해내고 있다고 보고되고 있다(Kwon 등, 2004). 하지만 바이러스 벡터의 기원이 병원성의 바이러스에서 기원하고, 바이러스가 변형이 쉽게 일어나는 안정성 문제가 제기되어 아직까지 검증단계에 머물러 있다(Freeman and Bumstead, 1987).

이런 문제를 해결하고자 본 연구에서는 생쥐(Lavitrano 등, 1989; Bachiller 등, 1991; Maione 등, 1998), 토끼(Brackett 등 1971; Kuznetsov and Kuznetsov, 1995), 돼지(Gandolfi 등, 1989; Sperandio 등, 1996), 닭(Fainsold 등, 1990), 개구리(Kroll and Amaya, 1996), 소(Perez 등, 1991; Sperandio 등, 1996)에서와 같이 정자를 이용한 방법을 이용하여 형질전환 닭을 생산하는 방법을 확립하였다.

하지만 이전 연구에서는 Liposome(Elian 등, 2009, Li BiChun 등, 2008)을 이용하여 형질전환 닭을 생산하였고 보고하고 있다. 하지만 높은 효율의 형질전환 닭을 생산하지는 못하였다. 그래서 본 연구에서는 외래 유전자의 전이율을 증가시키기 위하여 Amaxa Nucleofactor을 사용하였고, 형질 전환된 정자에서 mRNA를 추출하여 PCR을 통하여 확인한 결과 정자의 염색체 내로 삽입된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 이는 Liposome을 사용할 때 보다 더 높은 유전자 전이율을 보였고(Table. 3), 이 결과 높은 효율의 형질전환 닭의 생산이 가능 할 것이라 사료된다.

그리고 Kwon 등(2004) 바이러스 벡터를 사용했을 때 8.3%의 매우 낮은 부화율을 보여주는 것을 확인할 수 있는데, 본 연구에서는 정자 매개로 사용함으로써 부화율 30.3%까지 향상된 것을 확인할 수 있었다(Table. 3). 그리고 또한 닭의 stage X의 단계에서는 벌써 60,000개의 세포가 존재하기 때문에 고농도의 바이러스를 사용하여야 하고 고농도의 바이러스를 사용하지 않을 경우에는 모자이크 현상으로 인해 형질전환 닭의 생산율은 현저하게 떨어지게 된다(김 등, 2008). 하지만 본 연구에서는 정자를 매개로 형질전환 닭을 생산하므로써 모자이크 현상을 없애 형질전환 닭의 생산성을 크게 높였고(Fig. 5), 그리고 본 연구의 최종 목적인 BMP-2 유전자가 전이된 형질전환 닭을 생산하는데 성공하였으며, PCR을 통하여 형질전환 개체에서 발현 되는 것을 확인 하였다(Fig. 8). 앞으로 추가 실험 및 확인을 통해 형질전환 닭에서 BMP-2 단백질을 생산 할 수 있을 것이라 사료된다.

따라서 앞으로 연구에서는 성숙숙이 이루어진 다음 교배를 통해 다음세대로 BMP-2 유전자가 전달되는지 확인되어야 할 것이고, 계란에서 BMP-2 단백질의 발현 여부를 확인하여야 할 것이다. 본 연구를 통해 형질전환 가금을 비롯한 여러 동물의 생산에 있어서 매우 중요한 분자생물학적 정보와 기술을 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

VI. 요약

생활수준의 향상과 인간수명이 연장으로 인해 많은 유전자 재조합 단백질이 개발되어지고 있다. 하지만 포유류의 긴 세대간격과 우유에 분비되어진 유전자 재조합 단백질의 정제에 천문학적인 비용과 시간이 들어감으로써 아직까지 경제적인 생산을 할 수 없었다. 이에 반해 가금의 경우에는 세대간격이 짧고, 대량생산이 가능하고 계란의 난백에 포함된 단백질이 10여종으로 유전자 재조합 단백질의 정제시에도 적은비용으로 정제할 수 있다는 장점이 있다.

지금까지 형질전환 닭의 생산에는 거의 대부분의 바이러스 벡터를 사용하여 형질전환 닭을 생산하고 있다. 하지만 바이러스의 기원이 병원성이 있는 바이러스를 기원으로 하고 있어 안정성 등 다양한 문제를 내포하고 있다.

그래서 본 연구에서는 바이러스 벡터를 사용함으로써 생기는 문제를 해결하고, 정자를 매개로한 형질전환 닭 생산 방법을 확립하고자 실험을 실시하였다. 제주 토종닭으로부터 정자를 추출하여 Amaxa Nucleofactor을 이용하여 유전자를 전이 시켰다. 유전자가 전이된 정자를 암탉에게 인공수정을 실시하여 부화를 시켰다.

생산된 닭의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용하여 형질전환 개체를 확인 하였다. 그 결과 30.3%의 부화율과 63.3%의 형질전환율을 보였다. 이는 바이러스 벡터를 사용했을 때 보다 높은 부화율과 형질전환율을 확인할 수 있었다.

따라서 앞으로 연구에서는 성숙이 이루어진 다음 교배를 통해 다음세대로 BMP-2 유전자가 전달되는지 확인되어야 할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 형질전환 가금을 비롯한 여러 동물의 생산에 있어서 매우 중요한 분자생물학적 정보와 기술을 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

ABSTRACT

Production of transgenic chicken using the sperm vector.

Yong-Jun Kang

Department of Biotechnology, Graduate School
Jeju National University, Jeju, Korea

Improvement of living standards and life expectancy due to a lot of human recombinant proteins has been developed. Many researches have tried to apply large mammals as protein producing bioreactors. However, they have got some disadvantages such as long generation duration and the difficulties in purification of recombinant proteins from a complex milk protein mixture.

But chicken eggs are highlighted in this situation for their advantages. Short generation duration, high fecundity, and relative low costs for breeding support chicken eggs are excellent protein bioreactor. The most important advantage is purification of recombinant proteins in egg white is easier than in the milk.

So far, most of the producing methods of transgenic chickens use viral vectors. However, the origin of the virus is almost cause of pathogenicity and their stability also results in a variety of serious issues.

In this study, sperm mediated gene transfer (SMGT) to produce transgenic animals first time was established in chicken. Using Amaxa Nucleofector, the genes were transfected into the sperms that were extracted from Jeju native female chicken. After gene transfection, whole of the sperms were injected into the hens by Artificial Insemination. The eggs were harvested and incubated for egg hatching.

DNA genomes of hatching chicken were extracted and performed the specific PCR for confirmation of gene transgenesis.

As a results, the hatchability rate and transformation rate of chicken are 30.3 % and 63.3%, respectively. In our research, the hatchability rate and transformation rate are significantly higher in SMGT method than in viral vector method.

Following this success, we will produce the transgenic chicken with specific genes such as hBMP2, cytokines that are commercial value and high effective proteins in clinical treatment.

Through this study, transgenic poultry is a power bioreactor for producing a lot of human recombination proteins.



참고문헌

- Bachiller, D., K. Schellander., J. Prli and U. Ruther. 1991. Liposome-mediated DNA up-take by sperm cells. *Mol. Reprod. Develop.* 30:194-200.
- Brackett, B.G., Boranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 353 - 357.
- Buehler, T.A., Bruyere, T., Went, D.F., Stranzinger, G., Buerki, K. 1990. Rabbit κ -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Biotechnology* 8, 140 - 143.
- Carsience, R.S., Clark, M.E., Verrinder-Gibbins, A.M., Etches, R.J. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development.* 117(2):669-75.
- Chang, I. K., D. K. Jeong., Y. H. Hong., T. S. Park., Y. K. Moon., T. Ohno., J. Y. Han. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 21(8):495-9.
- Chapman, S. C., Lawson, A., Macarthur, W. C., Wiese, R. J., Loecchel, R. H., Trinidad, M. B., Wakefield, J. K., Ramabhadran, R., Mauch, T. J., Schoenwolf, G. C. 2005. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development.* 132:935-40.

Ebara, F and N. Fujihara. 2000. Successful transfer of exogenously introduced gene(lacZ/MiwZ and lacZ & GFP/pkcv4-lacZ) for the generations in chicken. *J. Reprod. Dev.* 46:177-182.

Ebert, K.M., Selgrath, J.P., Ditullio, P., Denman, J., Smith, T.E., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monastersky, G.M., Vitale, J.A., Gordon, K., 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology* 9, 835 - 840.

Eliane Harel-Markowitz, Michael Gurevich, Laurence S. Shore, Adi Katz, Yehuda Stram and Mordechai Shemesh. 2009. Use of Sperm Plasmid DNA Lipofection Combined with REMI (Restriction Enzyme-Mediated Insertion) for Production of Transgenic Chickens Expressing eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) or Human Follicle-Stimulating Hormone. *Biology of reproduction.* 80:1046-1052.

Etches, R.J., Clark, M.E., Toner, A., Liu, G., Verrinder-Gibbins, A.M. 1996. Contribution to somatic and germline lineage of chicken blastodermal cells maintained in culture. *Mol Reprod Dev* 45:291-298.

Eyal-Giladi, H., Ginsburg, M., Fabarov, A. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morph* 65:139-147.

Fainsold, A., Frumpkin, A., Rangini, Z., Revel, E., Yarus, S., Ben-Yehuda, A., Gruenbaum, Y. 1990. Chicken homeogenes expressed during gastrulation and the generation of transgenic chicken. In: *Proceedings of the EMBO-EMBL Symposium, Mol. Biol. Vertebrate*

Dev. 31.

Freeman, B. M. and N. Bumstead. 1987. Transgenic poultry : theory and practice. World's poul. Sci. J. 41:180-189.

Gandolfi, F., Lavitrano, M., Camaioni, A., Spadafora, C., Siracusa, G., Lauria, A. 1989. The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs, J. Reprod. Fertil. 4 (10) (abstract).

Gandolfi, F., Terqui, M., Modina, S., Brevini, T.A.L., Ajmone-Marsan, P., Foulon-Gauze, F., Courot, M. 1996. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA treated sperm. Reprod. Fertil. Dev. 8, 1055 - 1060.

Gilhooley, H.J., Kingsman, A.J., Mitrophanous, K.A., Sang, H. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Rep. 5:728-733.

Hamburger, V., Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J of Morph. 88:49-67.

Han, J. Y. and D. K. Jeong. 2002. Migration activity of chicken gonadal primordial germ cells(gPGCs) and post-transfer localization of LacZ-transfected gPGCs in the embryonic gonads. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15:1227-1231.

Han, J. Y., R. N. Shoffner and K. S. Guise. 1994. Gene transfer by manipulation of primordial germ cell in the chicken. Asian-Aust. J.

Anim. Sci. 7:427-434.

Harvey, A.J., Speksnijder, G., Baugh, L.R., Morris, J.A., Ivarie, R. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol.* 20:396-399.

Houdebine, L.M. 2008. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 32(2):107-21.

Ivarie, R. 2003. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.* 21:14-19.

Kamihira, M., Ono, K.I., Esaka, K., Nishijima, K.I., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., Iijima, S. 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retro-viral vector. *J Virol.* 79:10864-10874.

Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motono, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K., Kamihira, M., Iijima, S. 2008. Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun* 367:834-839.

Koo, B.C., Kwon, M.S., Choi, B.R., Kim, J.H., Cho, S.K., Sohn, S.H., Cho, E.J., Lee, H.T., Chang, W., Jeon, I., Park, J.K., Park, J.B., Kim, T. 2006. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.* 20:2251-2260.

Kwon, M.S., Koo, B.C., Choi, B.R., Kim, J.H., Park, Y.Y., Lee, Y.M., Suh, H.S., Park, Y.S., Lee, H.T., Kim, J.H., Roh, J.Y., Kim, N.H., Kim, T. 2008. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.

Kroll, K., Amaya, E., 1996. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantation reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development*. 122, 3173 - 3183.

Kuznetsov, A.V., Kuznetsov, I.V., 1995. The binding of exogenous DNA pRK3lacZ by rabbit spermatozoa, its transfer to oocytes and expression in preimplantation embryos. *Ontogenez*. 26, 300 - 309.

Kwon, M.S., Koo, B.C., Choi, B.R., Lee, H.T., Kim, Y.H., Ryu, W.S., Shim, H., Kim, J.H., Kim, N.H., Kim, T. 2004. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 320:442-448.

Lavitrano, M., A. Camaioni., V. M. Fazio., S. Dolci., M. G. Farace and C. Spadafora. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*. 57:717-723.

LI BiChun, SUN GuoBo, SUN HuaiChang, XU Qi, GAO Bo, ZHOU GuanYue, ZHAO WenMing, WU XinSheng, BAO WenBin, YU Fei, WANG KeHua and CHEN GuoHong. 2008. Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo and ex vivo transfection. *Sci China Ser C-Life Sci*. 51:734-742.

Lillico, S.G., McGrew, M.J., Sherman, A., Sang, H.M. 2005. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*. 10:191-196.

Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C., Kiessling, A., 1998. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 50, 406-409.

McGeew, M.J., Sherman, A., Ellard, F.M., Lillico, S.G., Gilhooley, H.J., Kingsman, A.J., Mitrophanous, K.A., Sang, H. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 5(7):728-33.

Naito, M., Sasaki, E., Ohtaki, M., Sakurai, M. 1994b. Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. *Mol Reprod and Dev.* 37:167-171.

Ogawa, S., K, Hayashi., N, Tada., M, Sato., T, Kurihara and M, Iwaya. 1995. Gene expression in blastocysts following direct injection of DNA into testis. *J. Reprod. Develop.* 41:379-382.

Park, T.S., Jeong, D.K., Kim, J.N., Song, G.H., Hong, Y.H., Lim, J.M., Han, J.Y. 2003. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod.* 68:1657-1662.

Perez, A., Solano, R., Castro, R., Leonart, R., de Armas, R., Martinez, R., Aguilar, A., Herrera, L., de la Fuente, J., 1991. Sperm cells mediated gene transfer in cattle. *Biotechnol. Aplicada*. 8, 90 - 94.

Perry, M., Morrice, D., Hettle, S. and Sang, H. 1991. Expression of exogenous DNA during the early development of the chick embryo. *Development Genes and Evolution*. 200:312-319.

Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M., Jones, A.J. 2000. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. 10:477-486.

Salter, D.W., E. J. Smith., S. H. Hughes., S. E, Wright and L. B. Crittenden. 1987. Transgenic chickens : Insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology*. 157:236-240.

Sang, H., Perry, M.M. 1989. Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, *Gallus domesticus*. *Mol Reprod Dev*. 1(2):98-106.

Sato. M., R. Iwase and N. Tada. 1994. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer. *Anim. Biotech*. 5:19-31.

Shuman, R. M., Shoffner., R. N. 1986. Gene transfer by avian retrovirus.

Poultry. Sci. 65:1437.

Simons, J.P., McClenaghan, M., Clark, A.J., 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. Nature 328, 530 - 532.

Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M.L., Forni, M., Maidone, B., Spadafora, C., Lavitrano, M., 1996. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. Anim. Biotechnol. 7, 59 - 77.

Swift, C.H. 1914. Origin and early history of the primordial germcells in the chick. Anat Rec. 202:483-515.

Van de Lavoie, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C.M., Heyer, B.S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L.T., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E., Etches, R.J. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature. 441:766-769.

Vick, L., Li, Y., Simkiss, K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. Proc Biol Sci. 251(1332):179-82.

Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., McKnight, R.A., Pittius, C.W., Henninhausen, L. 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 1696 - 1700.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. Eur J Oral Sci.

1998;106:160-6.

Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., Colman, A., 1991. High level of expression of active alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology* 9, 830-834.

Yamamoto, Y., Usui, F., Nakamura, Y., Ito, Y., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., Ono, T., Kagami, H., 2007. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol Reprod.* 77(1):115-9.

Zaccagnini, G., Maione, B., Lorenzini, R., Spadafora, C., 1998. Increased Production of Mouse Embryos in In Vitro Fertilization by Preincubating Sperm Cells with the Nuclease Inhibitor Aurintricarboxylic Acid. *Biology of reproduction.* 59, 1549 - 553.

Zhu, L., van de Lavoie, M.C., Albanese, J., Beenhouwer, D.O., Cardarelli, P.M., Cuisin, S., Deng, D.F., Deshpande, S., Diamond, J.H., Green, L., Halk, E.L., Heyer, B.S., Kay, R.M., Kerchner, A., Leighton, P.A., Mather-Love, C.M., Morrison, S.L., Nikolov, Z.L., Passmore, D.B., Pradas-Monne, A., Preston, B.T., Rangan, V.S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S.G., Winters-Digiaccinto, P., Wong, S., Zhou, W., Etches, R.J., 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol.* 23:1159-1169.

권모선, 구분철, 노지열, 이현아, 김태완. 2008. 재조합 hTPO를 생산하는 형질전환 닭의 개발. *Reprod. Dev. Biol.* 32(2):159-166.

김용국. 2008. 고부가성 형질전환 가축개발. 농촌진흥청.

김태완. 2008. 형질전환 및 세포(조혈세포) 배양기술을 이용한 바이오 신약의 산업화 - 바이러스 벡터를 이용한 G-CSF 생산 형질전환 닭 개발. 농촌진흥청.

김태윤. 2007. 인체 유용물질 대량 생산을 위한 형질전환 닭 생산. 농촌진흥청.

김향, 문성환, 이정옥, 김현민, 박민, 이환모. 2007. 인간 BMP-2-생리기능 복합 바이오활성 세라믹스를 이용한 조골 세포 분화 유도. 대한정형학회지. 42:386-394.

윤창현, 장규태, 김성현, 박미령, 주학진, 오석두, 이병오. 1999. 정소질내 유전자 도입에 의한 형질전환동물의 생산 II. 형질전환 한국재래 산양의 생산. 한국가축번식학회지. 23(1):13-18.

정동기. 2007. 닭 생식반월의 Busulfan 가온 주입방법에 의한 원시색식세포 제거 효과. 발생과생식, 11(3), 219-226.

한국보건산업진흥원. 2005. 재조합 단백질의약품 시장동향.

감 사 의 글

"자신이 이루고자 하는 일이 시련과 역경에 부딪쳐 그르치게 되면 보통 사람들은 절망하게 된다. 그러나 이것은 시련이지 실패가 아니다. 내가 실패라고 생각하지 않는 한 이것은 실패가 아니다. 나는 생명이 있는 한 실패는 없다고 생각한다. 내가 살아 있고 건강한 한 나한테 시련은 있을지언정 실패는 없다".

이 글은 고 정주영 회장의 '시련은 있어도 실패는 없다'에 나오는 한 구절입니다. 사람은 시련을 실패로 착각하거나 두려워 도전하기를 꺼려하는 것은 인간의 본성일지도 모른다는 생각을 해봅니다. 실험과 논문작성이 힘들 때마다, 제 자신의 한계에 부딪쳐 도망치고 싶을 때마다, 제게 언제나 희망이라는 단어와 최선을 다 하면 이루지 못할게 없다는 신념을 가지게 해준 주위의 많은 분들께 조금이나마 감사의 마음을 전하고자 이 글을 씁니다.

지난 2년 동안 너무나도 부족한 저를 언제나 믿어주시고 기회를 주신 정동기 교수님께 먼저 머리 숙여 마음 깊이 감사의 인사를 드리고 싶습니다. 가는 길이 힘들어 포기하고 싶을 때도, 제 자신을 믿지 못해 모든 것이 실패라고 생각 했을 때도, 저를 감싸주시고 제게 올바른 길로 갈 수 있는 지혜와 자세를 가르쳐 주신 교수님께 더 좋은 결과를 보여 드리지 못한 것 같아 너무나 송구스럽습니다. 하지만 교수님의 지도가 있었기에 어떠한 역경에서도 꺾이지 헤쳐 나갈 수 있는 지혜와 용기를 가지고 헤쳐 나갈 수 있게 되었다고 말씀드리고 싶습니다.

또한 바쁘신 일정임에도 불구하고 많은 조언과 논문을 교정 해주신 강민수 교수님과 양영훈 교수님께도 깊은 감사드립니다. 그리고 학교생활을 하는 동안 따뜻한 사랑과 격려를 아끼지 않으시고 올바른 길로 이끌어주신 김문철 교수님, 류연철 교수님께도 깊은 감사드립니다.

언제나 학과를 위해 고생하시고 타과에서 온 저의 학과생활에 큰 도움을 주신 윤미정 조교선생님과 박준형 조교에게도 이 자리를 빌어 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 동물 유전 공학 및 줄기세포 실험실 식구들에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 멀리 베트남에서 유학 온 베트남 연인 루안과 하, 부산에서 유학 온 지윤이, 우리 동네 사는 해령이, 지금은 실험실 식구는 아니지만 꿈 많은 정

선이, 지금은 캐나다에서 접시 닦고 있을 병훈이, 모든 일에 최선을 다하는 남일이형, 우리 실험에 없어서는 안 될 병아리를 공급해주는 태운이형, 멀리 베트남에서 유학 와서 정말 고생 많이 한 내 동기 트란콩, 마지막으로 중국에서 교환학생으로 와서 정말 열심히 생활하고 돌아간 원조하에게 정말 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 같이 대학원 생활을 하면서 많은 격려와 힘이 되어주는 “뭐든지 OK”이신 철수 형님, “그거 별거 아냐~”극 남발하시는 태준이형, 남원에서 고생하는 진우형, 인심 후한 미경이 누나, 지금은 휴학하고 있는 경균이형, 야구하는 경보형, 술이 좋은 미나, 부산 사나이 재호, 경보형이랑 야구하는 광훈이, 죽다 살아난 순희 그리고 마지막으로 만학도이지만 언제나 우리에게 좋은 본보기를 몸소 보여주시는 옥득 누나에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 이름은 말하지 않았지만 주위에서 많은 도움을 주신 많은 분들께 진심으로 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

부족한 저에게 이 모든 것을 이룰 수 있도록 항상 뒤에서 지켜봐주시고 제가 하고 싶은 일 모두를 할 수 있도록 도와주신 부모님께 정말 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 항상 동생이 잘 되기만을 바라는 큰형님, 큰형수님, 작은형님, 작은 형수님께도 이 자리를 빌어 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 힘들거나 지칠 때 많은 격려와 용기를 준 경민이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

저는 욕심쟁이입니다. 하고 싶은 일, 해야 하는 일, 하는 일 그리고 할 수 있는 일 모두를 해내고 싶습니다. 그래서 멈추지 않고 다시 걸겠습니다. 땀박질은 잘못해도, 어디까지고 한 걸음씩 내딛을 자신은 있습니다. 간간이 뒤돌아보고 주위도 살펴보면서 그렇게 걸어갈 생각입니다. 어차피 종점이 있는 길이 아니니까요.

2010년 7월 3일