

섬유소 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 돼지 생산

박진기[†] · 이연근 · 민관식 · 이창현 · 이향훈 · 김광식 · 장원경 ·
김진희¹ · 이훈택² · 정길생²
축산기술연구소 응용생명공학과

Production of Transgenic Pig Harboring the Cellulase Digest Gene(CeID)

Park, J. K.[†], Y. K. Lee, K. S. Min, C. H. Lee, H. H. Lee, K. S. Kim, W. K. Chang.

J. H. Kim¹, H. T. Lee² and K. S. Chung²

Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

ABSTRACT

This study was performed during the four seasons for the production of transgenic pigs containing the Cellulase Digest Gene. Purebred Landrace gilts and sows approximately 8~15 months of age (n=126) were used for the collection of 1-cell zygotes for DNA microinjection and transfer. Retrospectively, estrus synchronization and superovulation schemes were evaluated to assess practicality for zygote collection. Synchronization and superovulation procedures were used that cyclic gilts were synchronized with 20mg altrenogest (ALT) per day for 9 days after PG600 administration followed by superovulation with 1000 IU pregnant mares serum gonadotropin (PMSG) and 750IU human chorionic gonadotrophin (hCG). The cellulase digestion gene for microinjection is rat elastase promoter (rE1) linked to CeID gene. After hormone treatment, 1,422 embryos were collected from 91 donors and 95.6% (1,359/1,422) embryos were in 1-cell stage which can be visualized the pronuclei for DNA microinjection. A total of 725 DNA microinjected embryos transferred into 35 recipients and produced 65 piglets from 13 litters. Pregnancy rate according to the number of transferred embryos to recipients was higher the group which received 21 to 24 embryos (50.0%) than other groups 20.0% in less and 33.3% in more. A tail tissue was collected from 65 piglets for biopsy. PCR screening was performed on each DNA sample using two separate sets of primers specific for the 5'- and 3'-flanking region of the rE1-CeID gene. Five of the 65 piglets (7.69%) were positive for the transgene. This study provide useful information regarding production of transgenic pig for bioreactor research.

(Key words : Transgenic pig, rElastase I, Cellulase digest gene, Microinjection, Superovulation)

본 연구는 농림기술연구개발과제의 연구비로 수행하였음.

[†] Corresponding author : Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute. E-mail: parkjk@rda.go.kr

¹ Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

² College of Agriculture, Animal and Life Science, Konkuk University

I. 서 론

최근 유전자 재 조합기술이 발달하면서 Gordon 등(1980)에 의해 최초로 수정란 전핵내 미세주입 방법을 통한 형질전환 가축생산이 보고된 이후 1982년 Palmiter 등에 의해 Metallothionein growth hormone fusion gene이 도입된 형질전환 mouse를 생산함으로써 형질전환 동물생산의 기틀을 마련하였다. 이후 많은 과학자들에 의해 가축의 조직이나 혈액내 재조합 의료용 단백질 생산이 가능할 수 있다는 것이 제시되면서 Lathe 등(1985)은 유선세포야말로 의료용 단백질을 생산할 수 있는 이상적인 기관이라는 것을 시사하였다. 또한 유전자 도입에 관한 연구는 Hammer 등(1985)에 의해 토끼와 면양의 난자에서 시도되었으며, 돼지와 소에서는 Wall 등(1985)에 의해 보고되었다. Wall 등(1991)은 형질전환 가축을 생산하는데 있어 돼지를 사용하는 것은 돼지가 타 가축에 비해 세대간격이 짧고, 난자와 산자수가 많기 때문에 경제적으로 유리하다고 보고하였다. 일반적으로 수정란 전핵내 미세주입에 의한 형질전환 동물생산 효율은 소를 포함한 가축에 있어 효율이 1% 전후로 낮으며(Wall 등, 1996), 초기배 발달과 임신율에서도 감소하는 경향이 있다(Eyestone WE, 1994). 이러한 미세주입된 난자의 이식시 낮은 임신율과, 염색체내 낮은 Integration율은 수란축을 많이 확보해야 하는 경제적인 문제를 초래하였다. 따라서 초기연구들은 과배란 처리된 Donor로부터 회수된 Zygotes에 재조합 유전자를 즉시 주입하고 이식하였으며(Bowen 등, 1994; Eyestone 등, 1994), 이러한 *In Vivo* 유래의 수정란 이용은 많은 시설과 비용을 필요로 한다(Bowen 등, 1994; Hill 등, 1992). 많은 비용을 절감하기 위한 수단으로 체외생산 수정란을 이용하게 되었으며(Krimpenfort 등, 1991; Kruij 등, 1997), 이런 방법은 체내수정란을 이용하는 것보다 저 비용으로 많은 수의 수정란을 쉽게 획득할 수 있었다고 보고하였으며, Persel 등(1996)은 형질전환 동물

의 생산은 유전자 미세주입 후 수정란을 이식할 수란돈 뿐만 아니라 시험에 이용될 공란돈으로 부터의 수정란의 질에 의해 좌우된다고 하였다. 이러한 많은 연구보고가 있음에도 불구하고 아직까지도 형질전환 가축생산에 대한 보고는 극히 미흡한 편이다.

지금까지 알려진 *Clostridium thermocellum*속의 10개 이상의 섬유소 관련 유전자가 cloning되어 대장균에서 발현 검정하였으며 이중 Cel-A, -B, -C 와 -D 등 4종의 유전자에 관한 연구가 보고되었다(Begum et al., 1987). Endoglucanases는 섬유소 분해효소의 가수분해를 위해 필요로 하며(Begum et al., 1990), 구축된 CelD 유전자에는 intron부분에 hGH genome sequences를 포함하고 있으며 이러한 유전자를 통한 형질전환 효율에 관한 연구가 보고되었다(Brinster et al., 1988). 비 반추동물, 특히 돼지의 경우 섬유소 소화효율이 극히 낮은 것으로 알려져 있는데, 이는 식물세포벽을 분해하는 섬유소분해효소가 이들 동물에게는 생산되지 않기 때문이다. 식물세포벽을 소화하는 cellulase 효소를 췌장에 분비시킬 경우 소화효율이 적어도 10~30% 이상 향상 가능할 것으로 추정되며, 또한 농후사료가 아닌 열악한 조사료의 이용효율도 크게 향상될 것으로 기대된다. 소화효소는 췌장의 "acinar cell"에서 합성되어, zymogen granule에 packaging되며, 이는 다시 소장호르몬의 일종인 cholecystokinin (CCK)의 작용에 의하여 십이지장으로 분비될 것이다. 췌장에서 이들 소화관련 효소를 분비하기 위해서는 췌장에서 특이적으로 생성되는 최소한 9개 중에 1개가 serine protease인 rat elastase I (rEI)의 5'측 enhancer를 활용함으로써 췌장 외분비선인 acinar cell에서 CelD유전자를 고효율로 발현시키는 것이 가능할 것으로 추측하였다. 따라서 본 연구의 목적은 섬유소 분해효소를 갖고 있는 형질전환돼지를 생산함으로써 섬유소를 고 에너지원으로 활용하여 체지방을 줄이고, 저 콜레스테롤 고품질 돈육을 생산하는 형질전환 돼지를 생산하기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. rE1-CelD 발현 벡터 구축

본 실험에 사용된 돼지 수정란 전핵 내 주입용 발현벡터는 Fig. 1과 같다. 먼저 목적유전자를 소의 제4위에서 기생하는 미생물로부터 전체유전자를 분리한 후 DNA library를 작성하고 이들 library로부터 섬유소분해효소 유전자를 클로닝하였으며, Promoter의 경우 흰쥐의 조직으로부터 genome DNA를 추출한 후 Gene Bank의 유전자 배열을 참고로 클로닝 하였다. 클로닝된 각각의 유전자는 약 200 bp의 rElastase I promoter 하류에 약 2.0kb의 CelD를 연결하였으며, CelD의 전·후에는 각각 hGH intron 부분과 hGH PolyA 부분이 존재하도록 재조합하였다.

재조합 발현벡터는 다시 pBluSK(+) 벡터에서 클로닝하여 초원심분리 방법으로 순수 정제시킨 후 EcoR I과 Sal I 제한효소로 목표하는 부위만을 절단하였다. 제한효소 처리된 단편들을 0.9% 아가로즈겔 전기영동 후 이들의 DNA 단편을 아가로즈로부터 회수하고 2회 정제하였으며, 최종농도는 2~4 ng/ul로 희석하여 미세주입용 발현벡터로 준비하였다.

2. 발정동기화 및 과배란유기

PG600 (Intervert International, B.V Boxmeer, Holland) 주입 후 9일간 Altrenogest (Regumate, Hoechst Roussel Pharmaceuticals Inc., Somerville, NJ)를 매일 두당 사료 2kg에 20mg을 혼합하여 급여하였으며 그후 과배란은 PMSG(Intervert International, B.V Boxmeer, Holland)를 1000IU 근육주사한 후 72시간이 경과되었을 때 750IU의 hCG를 근육주사하여 과배란을 실시한다.

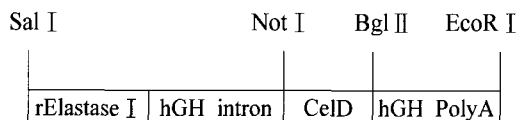


Fig 1. Recombinant gene constructed for micro-injection into the pocine pronuclear.

hCG (Intervert International, B.V Boxmeer, Holland) 투여후 매일 09시와 18시에 2회씩 육안적 관찰을 실시하여 점액의 유무, 음부의 상태 및 부동 자세 등 발정 초기증상이 나타난 증빈돈에 한하여 성성숙된 수태지를 접촉시켜 최초 수태지 허용시 1회 자연교배를 실시하였으며 1회 자연교배 후 24시간에 2회 교배를 실시하였다.

3. 외과적 수술 및 수정란 회수

마취제로는 하이프노딜(JANSSEN, German) 7~8ml를 돼지 귀 정맥에 주입하여 1차 마취를 실시하고, 그 후 가연성 흡입마취제인 할로탄 가스(신성신약) 3~5%를 산소(600~1,000ml/분) 순환 시스템에 연결하여 마취상태를 유지시키면서 공관돈의 난관은 자궁-난관접합부에 18gauge 주사바늘을 이용하여 1회용 주사기로 1% BSA(Sigma, USA)와 항생제를 혼합한 25ml의 D-PBS(Gibco · Laboratories, USA)를 난관 관류시킴으로써 수정란을 회수하였다. 관류된 D-PBS는 멸균시험튜브에 수집하여 실온에서 난자를 회수하여 실험현미경상에서 수정 유무를 판단한 후 1세포기 수정란만을 이용하였다.

4. Micropipets의 제작 및 유전자 미세주입

외경이 1mm이고 길이가 13cm인 유리관 (Garner glass, USA)으로 고정용과 주입용의 micropipets를 제작한다. 먼저 이 유리관을 puller(David korf 720, USA)에 장치한 다음 끝의 길이가 1~1.5cm 정도 되도록 pulling한다. 그리고 모든 micropipet의 끝을 microforge로 15~30° 정도 구부려서 사용한다. 외래유전자의 미세주입은 미세조작기 (micromanipulatpr : Nikon, Japan)를 이용하여 수정란의 응성 전핵에 주입하였는데, 이때 핵막의 용이한 관찰과 실험의 편리함을 도모하기 위하여 DIC system을 갖춘 도립현미경하에서 수행하였으며, 외래유전자의 미세주입시 농도와 양은 2pg/2pl로 약 600 copies에 해당되며, 또한 체내수정란의 전핵 노출을 위해 15,000rpm에서 15분간 원심분리를 실시하였다.

5. 수정란의 외과적 이식

돼지의 수정란을 이식하여 산자를 생산할 목적으로 외과적인 방법에 의해서 수정란 이식을 실시하였다. 먼저 호르몬 처리에 의해서 발정이 동기화된 수란돈 또는 자연적으로 발정주기가 동기화된 수란돈을 전신마취를 실시한다. 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게 면도기를 이용하여 털을 제거하고 소독을 실시한 다음 정중선을 약 10~15cm를 절개하여 생식기를 노출시킨 후 난소 표면의 황체의 존재를 확인한 후, 수정란 20~50개가 함유된 배양액의 채워진 polycatether (Cook, Australia)를 난관 팽대부에 넣고, 수정란이 함유된 배양액을 1ml 주사기를 이용하여 이식하였다.

6. 도입된 외래 유전자의 분석

수정란 이식 후 분만된 자돈의 꼬리조직을 채취한 후 1300g로 15분간 원심분리 후 20 µg/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS가 첨가된 TE-buffer 15 ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 둔 후 100 µg/ml proteinase K(Merk, Darmstadt, Germany)을 첨가하고 즉시 55°C의 incubator에서 3시간 동안 용해시켰다. 처리 후 이들 시료를 꺼내 같은 양의 phenol을 첨가하여 genome DNA를 분리하였다. 분리된 genome DNA는 제작된 Primer(Forward 5'-TGC TGA TAA GAG CCG TAT AAA G-3', Reverse 5'-ATT TGC ATC TAT AGT CGC CTT T-3')를 이용 PCR mixture를 만든 후 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분간 35cycle를 반복한 후, PCR산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

III. 결 과

1. 외과적 방법에 의한 돼지수정란 채란 성적 호르몬 처리에 의한 발정동기화 및 과배란 처리

된 돼지의 외과적인 방법에 의한 과 배란 및 수정란 회수 성적은 Table 1과 같다. 총 91두의 공란돈으로부터 1,422개의 난자를 회수하였으며 그 중 1,359개가 1-cell 단계의 수정란으로 전체 회수란 중 약 95.6%이며, 공란돈 1두당 평균 회수된 수정란수는 14.9개였다.

2. 외과적인 방법에 의한 수정란 이식 성적

총 35두의 수란돈에 대한 미세주입된 수정란의 이식 결과 및 분만 결과는 Table 2와 같다. 외과적 방법으로 채란된 1,359개의 수정란 중 전핵내 유전자를 미세주입한 전체 수정란수는 725개로 1세포기 수정란 대비 53.3%였다. 유전자 주입된 725개의 수정란은 총 35두의 수란돈에 외과적인 방법으로 이식하였다. 수란돈 마리당 이식된 수정란수는 평균 21개였으며, 분만두수 13두, 산자수 65두로 분만율은 37.1%, 마리당 평균 산자수는 5두였다.

3. 수정란 이식시 수정란수와 임신율

Table 3은 유전자가 미세주입된 수정란 이식시 난자수가 임신율에 미치는 영향을 조사하였다. 이식된 난자수별 임신율은 각각 21개 이하, 21~24개 및 25개 이상으로 구분하여 조사하였으며 21~24개 이식시 임신율은 50%로 이보다 적거나 많은 난자를 이식시보다 높게 나타났다. 그러나 임신된 마리당 평균 산자수에서는 난자수와 상관없이 20개 이하에서 7두, 21~25개에서 약 5두, 25개 이상에서 약 3두로 수정란수가 산자수를 좌우하지는 않았다.

4. 분만 자돈에 대한 PCR검정

유전자가 미세주입된 수정란이식 후 태어난 자돈 65두에 대한 PCR검정 결과는 Fig. 2와 같다. CelD 특이 Primer에 의한 PCR수행 후 전기영동 결과를 Φ 174 Hae III로 digested된 pUC18 Size marker

Table 1. Results of oocytes recovered by surgical method

No. of donors	No. of recovered oocytes	Embryos development to			No. of non-fertilized	Average of 1-cell oocytes
		1-cell	2-cell	4-cell		
91	1,422	1,359	15	5	43	14.9

Table 2. Results of oocytes transferred by surgical method

No. of recipients	No. of transferred oocytes	Transferred oocytes/head	No. of parturation	No. of piglets
35	725	21	13	65

Table 3. Effect of number of transferred embryos per recipient on pregnancy rate

No. of embryos transferred	No. of embryos injected	No. of recipient	No.(%) of pregnant	No. of piglets
<20	154	10	2(20.0)	14
21 to 24	345	16	8(50.0)	41
≥25	226	9	3(33.3)	10

와 비교한 결과 예측된 크기의 약 600bp에서 band를 확인할 수 있었다.

질전환 율에 대한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이 65두중 5두가 형질전환된 것으로 판정되었으며 형질전환 된 5두중 암·수 비율은 각각 2두와 3두로 형질전환율은 암컷 6.06%, 수컷 9.38%로 평균 7.69%의 형질전환율을

5. 형질전환돼지 생산 및 형질전환율

rE1-CelD 유전자가 도입된 형질전환 돼지 및 형

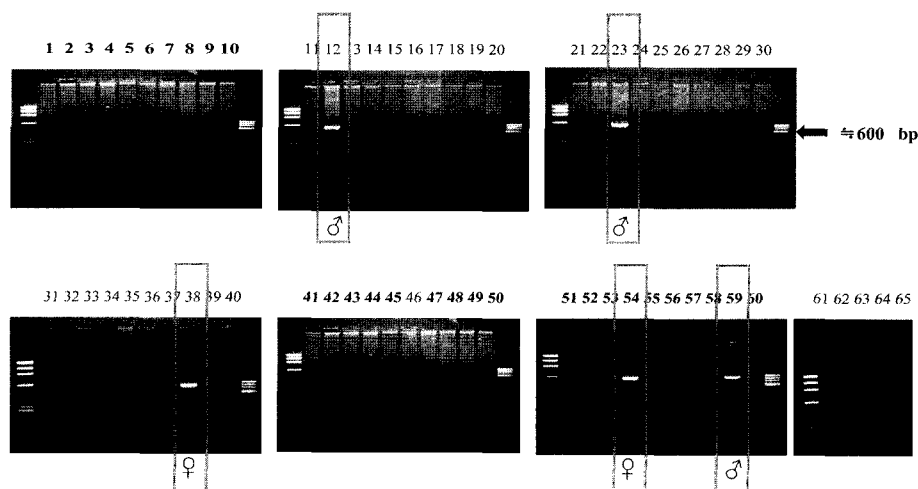


Fig 2. Agarose gel electrophoresis showing PCR products obtained from 65 piglets. Lines 12, 23, 38, 53, and 57 show detection of the transgene. Other lines were not show the transgene.

Table 4. Transgenic rate and production of transgenic piglets harboring cellulose digest gene

No. of litters	Total of piglets		Transgenic pigs		Transgenic rate(%)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
13	33	32	2	3	6.06	9.38
Total	65		5		7.69	

나타냈다.

IV. 고 찰

일반적으로 유전자가 미세주입된 수정란은 그렇지 않은 것에 비해 발달율이 50%까지 감소하는 것으로 보고되었다(Hadju 등, 1994; Hammer 등, 1986; Kaubisch 등, 1995). 보고되지 않은 우리의 결과에 의하면 체외수정란 내 미세주입 후 배발달율은 약 22.2%로 Funahash 등(1994), Williams 등(1992)와 유사하였으나 Kubisch 등(1995)의 결과 보다는 낮았으며, 체내수정란 생산을 위한 수정란 회수율은 Schlieper 등(1986), White 등(1988)이 보고한 결과보다 낮았으나 Martin 등(1990)이 보고한 72.9%와는 유사한 결과를 보였는데 수정란 회수율이 낮은 것은 아마 operator의 실수나 수정란 회수시 Surgery의 부적절한 시간에 기인하는 것으로 본다. William 등(1992)은 배란과 발정시간을 정확히 판단하는 것은 쉽지 않다고 하였으며 이것은 곧 1세포기 수정란을 생산하는 능력과 관련 있다고 하였다. Hajdu 등(1994)이 1세포기 수정란 회수율을 86.4%로 보고하였으나 우리의 결과는 95.6%(1,359/1,422)로 이들의 결과보다 다소 높았다. 체내수정란을 이용한 형질전환 가축생산 시 무엇보다 중요한 것은 수정란의 회수에도 있겠으나 더욱 중요한 것은 hCG 주입 후 수정란 회수시 자.웅 전핵을 볼 수 있는 수정란을 얼마나 많이 얻을 수 있는가 하는 문제이다(Hajdu 등, 1994; Williams 등, 1992). 본 연구에서는 hCG주입 후 54시간 전·후에서 전핵 노출이 가능한 많은 수정란을 얻을 수 있었으며 이것은 Persel 등(1996)의 보고와 거의 유사하였다. 수정란의 발달 단계에 대한 변이는 배란 시점에서의 조절이 중요하므로 배란유기시 hCH주입 시기에 의해 좌우될 수 있다(Soede 등, 1992). 그러므로 우리의 결과는 hCG 주입 농도를 500 내지 750IU를 주입함으로써 과배란을 유기할 수 있었으며 동기화된 One cell stage의 수정란을 회수할 수 있었다. 이식 시 수정란의 수가 임신율에 미치는 영향에 관한 연구는 Brem 등(1985), Wei 등(1993)에 의해 보고되었으며 우리의 보고되지 않은 결과

에 의하면 21~24개의 수정란을 이식 시 그보다 적거나 많은 수의 수정란 이식시 보다 약간의 차이를 보였는데 이것은 1993년 Wei 등의 보고와 거의 유사한 것으로 바서 수정란의 수가 임신율에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 보며, 다만 미세주입된 난자와 그렇지 않은 난자를 이식할 시에는 약간의 차이가 있는 것으로 보고되었다(Eyestone 등, 1994). 사실 형질전환 돼지를 생산하기 위해서 아니면 수정란 이식시 임신율에 미치는 중요한 요인은 수란돈과 공란돈 간의 발정동기화이며 동기화 정도에 따라 수정란 이식 후 초기배의 사망, 착상 지연 및 배 성장과 발달 등과 같은 복잡한 문제들이 일어나곤 한다(Barnes 등, 2000). 이러한 연구 수행 결과에도 불구하고 세계적으로 미세주입에 의한 형질전환 돼지 생산율은 거의 1% 전·후에 머물고 있는 실정이다(Wall 등, 1996).

결론적으로 우리의 data에서 보는 바와 같이 미세주입 방법을 통해 생산된 형질전환 돼지를 이용하여 섬유소 소화율을 개선할 수 있다면 돼지 사육에 있어 사료효율을 높이고 생산성을 향상시키는데 일조할 것으로 기대한다.

V. 요약

본 연구는 섬유소분해효소 유전자(CelD)가 도입된 형질전환 돼지를 생산하기 위해 사계절동안 수행하였다. 약 8~15개월령의 순종의 랜드레이스 경산돈 및 미경산돈 126두는 유전자 미세주입을 위한 1세포기 단계의 수정란 채란 및 이식을 위해 사용하였으며, 발정동기화 및 과배란 방법은 PG600 주입 후 9일간 매일 20mg의 altrenogest를 사료에 첨가하여 급여하였다. Altrenogest를 9일간 급여 후 1000IU의 PMSG와 750IU의 hCG를 주입하므로써 과배란을 유도하였다. 미세주입을 위한 유전자는 Rat elastase promoter에 CelD 유전자를 연결하여 준비하였으며, 호르몬 처리후 91두의 공란돈으로부터 1,422개의 난자를 회수하였으며 이중 95.6%(1,359/1,422)는 DNA 미세주입을 위해 전핵을 관찰할 수 있는 1세포기의 수정란이었다. 이중 유전자가 미세주입된 725개의 난자를 35두의 수란돈에

이식하였으며 13두의 임신돈으로부터 65두의 자돈을 생산하였다. 한편 수란돈당 수정란 이식수가 임신율에 미치는 영향을 조사한 결과 약 21~24개의 수정란을 이식한 구에서 임신율이 50%로 타구의 20.0%(20개 이하)와 33.3%(25개 이상)보다 높았으며, 꼬리조직으로부터 분리된 DNA의 PCR검정결과 65두중 5두가 형질전환 양성 반응을 나타내어 7.69%의 형질전환율을 나타내었다. 따라서 본 연구는 생체반응기를 통한 형질전환 돼지생산을 위한 유용한 정보를 제공하게 될 것이다.

VI. 인용문헌

- Barnes, F. L. 2000. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, 53: 649-658.
- Beguín, P., Millet, J. and Aubert, J. P. 1987. The cloned cel(cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* and their products. *Microbiol. Sci.*, Sep;4(9):277-280.
- Beguín, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44:219-248.
- Bowen, R., Reed, M., Schnieke, A., Seidel, G., Brink, Z., Stacey, A., Thomas, W. and Kajikawa, K. 1994. Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: Expression of c-ski in a transgenic calf. *Biol. Reprod.*, 6:647-652.
- Brem, G., Brenig, B., Goodman, H. M., Selden, R. C., Graf, F., Kruff, B., Springman, K., Hondele, J., MEyer, J., Winnaker, E-I. and Krausslich, H. 1985. Production of transgenic mice, rabbit and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 20:251-252.
- Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. and Palmiter, R. D. 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:836-40.
- Eyestone, W. H. 1994. Challenges and progress in the production of transgenic cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:647-652.
- Funahashi, H., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Cantley, T. C., Rieke, A. and Day, B. N. 1994a. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 39:965-973.
- Gordon, J., Scagnos, G., Plotkin, D., Barbosa, J. and Ruddle, F. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.
- Hajdu, M. A., Knight, J. W., Canseco, R. S., Krisher, R. L., Velandar, W. H., Pearso, K. E. and Gwazdauskas, F. C. 1994. Effect of culture conditions, Donor age, and Injection Site on *in vitro* Development of DNA Microinjected Porcine Zygotes. *J. Anim. Sci.*, 72:1299-1305.
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.*, 315:680-683.
- Hill, K., Curry, J., DeMayo, F., Jones-Diller, K., Slapak, J. and Bondioli, K. 1992. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Theriogenology*, 37:222abstr.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Brook, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R. and de Boer, H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle by *in vitro* embryo production. *Bio. Technology*, 9:844-847.
- Kruip, T. A. M. and den Daas, J. H. G. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effect on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47:43-52.
- Kubisch, H. M., Larson, M. A., Funahashi, H., Day, B. N. and Roberts, R. M. 1995. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology*, 44:391-401.

16. Lathe, R., Clark, A., Archibald, A., Bishop, JI, Simons, P. and Wilmut, I. Novel products from livestock. In: Smith, C., King, W. McKay, J., (eds). 1985. Exploiting new technology in animal breeding. Oxford: Science Publications 99-102.
 17. Martin, M. J., Didion, B. A. and Markert. C. L. 1990. Characterization of fertilization and early embryonic development of naturally ovulated pig ova. *Theriogenology*, 33:284.
 18. Palmiter, R., Brinster, R., Hammer, R., Trubauer, M., Rosenfeld, M., Birnberg, N. and Evans, R. 1982. Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionine growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611-615.
 19. Pursel, V. G. and Wall, R. J. 1996. Effect of transferred ova per recipient and Dual use of donors as recipients on production of transgenic swine. *Theriogenology*, 46:201-209.
 20. Schlieper, B. and Holtz, W. 1986. Transfer of pig embryos collected by laparotomy or slaughter. *Anim. Reprod. Sci.*, 12:109-114.
 21. Soede, N. M., Noordhuizen, P. P. T. M. and Kemp, B. 1992. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*, 38:653.
 22. Wall, R. J., Pursel, V. G., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.*, 32:645-651.
 23. Wall, R. J., Pursel, V. G., Shamay, R. A., Mc-Kinght., Pittius, C. W. and Hennighausen, L. 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88: 1696.
 24. Wall, R. 1996. Modification of milk composition in transgenic animals. In: Miller rh, Persel VG, Norman HD(eds), *Beltsville Symposia in Agricultural Research XX: Biotechnology's role in the Genetic Improvement of Farm Animals*. Savoy, Illinois: American Society of Animal Science. 165-188.
 25. Wei, Q., Fan, J. and Chen, D. 1993. Effect of number of transferred microinjected embryos on pregnancy rate and litter size of pigs. *Theriogenology*, 39:338 abstr.
 26. White, K. L., Southern, L. L., Rickords, L. F. and Wood, T. C. 1988. Embryonic development and quality in cycling crossbreed gilts following altrenogest synchronization and exogenous gonadotrophin administration. *Theriogenology*, 29:326 abstr.
 27. Williams, B. L., Sparks, A. E. T., Canseco, R. S., Knight, J. W., Johnson, J. L., Velandar, W. H., Page, R. L., Drohan, W. N., Kornegay, E. T., Pearson, R. E., Wilkins, T. D. and Gwazdauskas, F. C. 1992. Evaluation of systems for collection of porcine zygetes for DNA microinjection and transfer. *Theriogenology*, 38:501-511.
 28. Williams, B. L., Sparks, A. E. T., Canseco, R. S., Knight, J. W., Johnson, J. L., Velandar, W. H., Page, R. L., Drohan, W. N., Young, J. M., Pearson, R. E., Pearson, R. E., Wilkins, T. D. and Gwazdauskas, F. C. 1992. *In vitro* development of zygotes from prepubertal gilts after microinjection of DNA. *J. Anim. Sci.*, 70:2207-2211.
- (접수일자: 2002. 3. 22. / 채택일자: 2002. 4. 20.)