

# 체외 배양 체계가 체외수정 및 유전자 미세주입 수정란의 발달에 미치는 영향

박용수<sup>†</sup> · 민관식<sup>1</sup>

경상북도 축산기술연구소

## 초 록

본 연구에서는 배양 체계(혈청 첨가; TCM199, TALP, CR1aa 및 혈청 미첨가; IVMD101, IVF100, IVMD101)가 체외수정 또는 미세주입된 수정란의 체외 발달에 미치는 효과를 검토하였다. 또한 미세주입에 사용하는 GFP 유전자의 양 및 미세주입 수정란에서 형광발현 양상을 검토하였다. 체외수정된 수정란의  $\geq 2$ 세포기, 8세포기 및 배반포 도달율이 미세주입 수정란에 비하여 유의하게 높았다. 혈청 미첨가 배지에서 8세포기 발달율이 수정란의 종류에 관계없이 유의하게 높았으나( $p < 0.05$ ; 3.3% vs. 15.5% 및 21.4% vs. 39.4%, respectively), 배반포 도달율은 유사한 경향이었다(2.7% vs. 2.3% 및 23.0% vs. 23.6%, respectively). 한편, 2ng/uL 유전자를 미세주입한 수정란의  $\geq 2$ 세포기, 8세포기 및 배반포 도달율이 4 및 8ng/uL의 것에 비하여 높은 경향이었다. 미세주입 수정란의 형광발현율은 1세포기가 2 및 8세포기에 비하여 유의하게 높았으나( $p < 0.05$ ), 4세포기 및 배반포 단계와는 차이가 없었다.

(주제어 : Bovine, Microinjection, GFP)

## 서 론

Lin(1966)이 mice 난자 내에 bovine gamma globulin을 미세주입에 성공한 이후 rabbit, pig, sheep, goat 및 cattle에서 미세주입법을 이용하여 형질전환 동물을 생산하였다(Hammer 등, 1985; Ebert 등, 1991; Hill 등, 1992; Pollock 등, 1999; Behboodi 등, 2001). 지금까지 연구에서 외래 유전자를 genome 내에 주입하는 미세주입법이 mouse를 비롯한 실험동물에서는 비교적 체계화되었다(Cousens 등, 1994). 이 기술을 이용하여 여러 가지 생물학적 또는 의학적으로 유용한 물질을 대량 생산하려면 가축에서 생산이 가능해야 한다(Wall, 1996). 그러나 가축에서는 실험동물에 비하여 긴 임신 기간, 낮은 효율 및 산자 생산을 감소 등의 문제점이 있다(Rieth 등, 1999). 또한 재조합 유전자의 미세주입은 genome으로 유전자 integration이 불규칙하게 일어나고 세포내로의 integration 문제가 있다(Wang 등, 2001). 그리고 사용하는 유전자의 농도와 repair system 및 표적 세포에서의 replication과 transcriptional도 영향을 미친다(Wall, 1997).

한편 미세주입 성공률이 mice의 7%에 비하여 소에서는 0.7%로서 아주 낮다(Brinster 등, 1985; Wall, 1996). 대가축에서 형질전환 성공을 위해서는 낮은 배발달을 및 이식 비용 절감을 위한 형질전환 수정란의 조기 선발이 필요하다(Krisher 등, 1994). 형질전환된 수정란을 조기에 확인하기 위해서 green fluorescent protein(GFP) 유전자가 mouse(Takada 등, 1997) 및 소(Chan 등, 1997; Takada 등, 1997)

수정란에 성공적으로 사용되었다. GFP 유전자는 jellyfish (*Quorea victorialis*)에 유래한 형광 발광 물질로서 eukaryotic 또는 prokaryotic 세포에서 발현되어 녹색 형광을 발현한다(Chalfie 등, 1994; Prasher, 1995). GFP 유전자를 이용한다면 배 발생단계에서 형질전환 또는 mosaicism을 사전에 확인하므로 형질전환 가축의 생산성을 높일 수 있을 것이다(Wall, 1997; Menck 등, 1998).

미세주입된 수정란의 낮은 발달율을 극복하기 위하여 배양체계(Devgan과 Seshagiri, 2003; 김 등, 2001), 체외수정 후 미세주입 시간(Krisher 등, 1994; Peura 등, 1994), 유전자 발현율(Chan 등; Wang 등, 2001) 및 DNA 량(Menck 등, 1998)에 대한 검토가 있었다. 최근 무혈청 배지가 각종 수정란의 발생에 효과적이라고 하였으나(Hochi 등, 2003) 형질전환 수정란의 발생에 대한 검토는 없었다.

본 연구에서는 배양 체계(혈청 첨가 및 혈청 미첨가)가 체외수정 및 미세주입된 수정란의 발달에 대한 효과와 미세주입에 사용하는 유전자의 양 및 수정란에서 GFP 유전자의 발현 양상을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 배지

#### 1) 혈청 첨가 배지

\* This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry.

<sup>1</sup> 한경대학교 생명정보통신대학원(Animal Biotechnology, The Graduate School of Bio. & Information Technology, Hankyong National University)

<sup>†</sup> Corresponding author : Dr. Yong-Soo Park, Kyoungbuk Livestock Research Institute, TEL: +82-54-638-6012, E-mail: pps0112@chollian.net

난소로부터 미성숙 난포란의 회수용 배지는 10mM HEPES와 3mg/mL bovine serum albumin(BSA: Sigma, A-9647)이 첨가된 TALP(HEPES-TALP) 용액이다. 난포란의 체외성숙용 배지는 0.22mg/mL pyruvate(Sigma, P-5280), 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, 16000-044), 1mg/mL follicle stimulating hormone(Sigma, F-8174), 10 $\mu$ g/mL luteinizing hormone(Sigma, L-9773), 10mg/mL heparin (Sigma, H-3149)이 각각 첨가된 TCM199(Gibco, 12340-030) 배지를 사용하였다. 체외수정용 배지는 6mg/mL BSA (Sigma, A-6003) 및 10mg/mL heparin (Sigma, H-3149)이 첨가된 IVF-TALP 용액이며, 정자처리용 배지는 3mg/mL fraction V BSA(Sigma, A-9647)가 첨가된 Sperm-TALP 용액이다. 한편 체외배양용 배지는 3mg/mL BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액이다. 그리고 실험에 제공되는 모든 배지는 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

## 2) 혈청 미첨가 배지

체외성숙용 배지는 IVMD101(IFP, IVMD101), 체외수정 및 정자처리용 배지는 IVF100(IFP, IVF100) 및 체외배양용 배지는 IVMD101을 각각 이용하였다(Im 등, 2004). 배양 조건은 혈청첨가배지와 동일하다.

## 난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 $\mu$ g/mL gentamycin (Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18G 주사침이 부착된 10mL 주사기를 이용하여 직경 2~8mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실제현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 $\mu$ L의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 20시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

## 체외수정

한우 동결정액 1개(KPN388)를 실온에서 10초간, 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll (Sigma, P4937) 2mL 용액이 담겨져 있는 15mL 원심분리관(Corning, 430052)에 살며시 놓은 후 700g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2mL Sperm-TALP 용액으로 350g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25 $\times 10^6$  spermatozoa/mL가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어져 있는 46 $\mu$ L의 체외수정용 배지에 heparin 2 $\mu$ L와 정자 2 $\mu$ L를 첨가(최종 정자농도 1 $\times 10^6$  spermatozoa/mL)하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 20시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

## 미세주입용 유전자 구축 및 미세주입

### 1) 유전자 구축

Min 등(2004)이 사용한 pABWN 동물세포 발현벡터를 이용하여  $\beta$ -actin promoter 하류에 Xho I site에 XhoI과

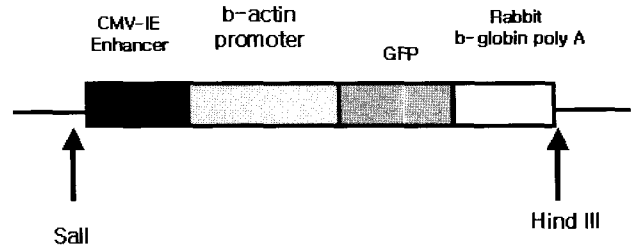
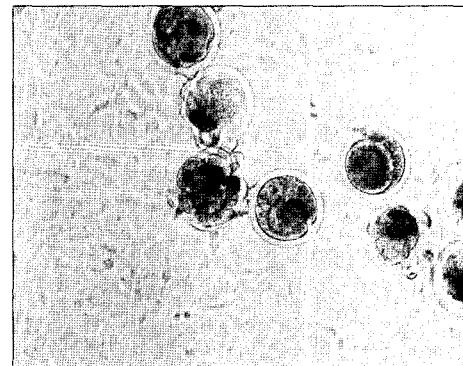


Fig. 1. Schematic diagram of the GFP transgene used for microinjection.

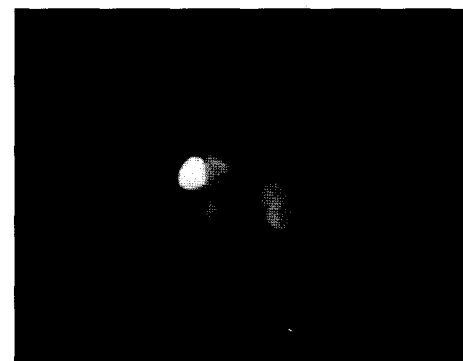
Sal I으로 절단한 GFP 유전자를 삽입하여 GFP 미세주입용 유전자를 구축하였다(Fig. 1).

### 2) 유전자 미세주입

체외수정 18~19시간째에 수정란을 0.3% Hyaluronadise (Sigma, H-4272)를 5분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 수정란은 10% FBS가 첨가된 1mL TCM199 배지에 넣고 15,000g, 5분간 원심분리 하였다. 수정란은 20 $\mu$ L의 10% FBS 첨가 TCM199 배지에 넣고, 도립현미경(Olympus)에서 미세조작장치(Narishige)를 이용하여 응성전핵 내에 DNA를 미세주입하였다. 미세주입 수정란에서 유전자의 발현 검정은 EGFP filter(EX 488-507; Olympus, Japan) 하에서 하였다(Fig. 2).



<A>



<B>

Fig. 2. Bovine embryos that developed to the 8- and 4-cell stage on day 3 after pronuclear microinjection with the GFP gene <A>. Intensities of light was emitted by the embryos under the fluorescence microscope <B>.

**체외배양**

체외수정 또는 미세주입된 수정란(배양 1일)은 3mg/mL BSA가 첨가된 체외배양용 배지로 2회 세척한 후 미리 준비한 20  $\mu$ L 배지에 20개씩 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 배양 3 및 5일째에 10% FBS가 첨가된 체외배양용 배지로 교환하여 배양하였다.

**통계처리**

실험결과에 대한 통계학적 분석은  $\chi^2$ -test와 SPSS 10.0 프로그램 이용한 일원배치 분산분석을 통한 Duncan's test를 실시하였으며, 유의차는  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

**결 과**

체외배양 체계가 체외수정 또는 유전자 미세주입 수정란의 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 체외수정 수정란의 수정율( $\geq 2$  cell), 8세포기 및 배반포 발달율이 미세주입 수정란에 비하여 유의하게 높은 경향이 있었다( $p < 0.05$ ). 한편 배양 체계에 따른 미세주입 수정란의 발달율은 수정율은 25.3 및 31.0%로서 비슷하였으나, 8세포기 발달율은 IVMD 군이 15.5%로서 CR1aa 군의 3.3%보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 배반포 발달율은 2.3 및 2.7%로서 유사한 경향이였다. 배양체계에 따른 체외수정 수정란의 수정율과 8세포기 발달율은 IVMD 군이 76.4

및 39.4%로서 CR1aa 군의 63.5 및 21.4%에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 배반포기 발달율은 23.0 및 23.6%로서 각 군간에 차이가 없었다.

미세주입에 이용한 유전자 농도가 미세주입 수정란의 발달율에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 수정율은 2ng/uL 군이 54.1%로서 4 및 8 ng/uL 군의 28.5 및 28.8%에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 8세포기 발달율은 2 및 4 ng/uL 군이 21.3 및 14.6%로서 8 ng/uL 군의 5.8%와 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ). 그러나 배반포 발달율은 각 군에서 0~8.2%로서 2ng/uL 군이 높은 경향이였으나 유의성은 인정되지 않았다.

배 발달 단계에 따른 형광색 발현율을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 총 131개의 미세주입 수정란의 형광색 발현율이 1세포기, 2세포기, 4세포기, 8세포기 및 배반포기에서 각각 51.7, 28.6, 42.9, 30.6 및 33.3%로서, 1세포기의 발현율이 2세포기 및 8세포기의 것보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

미세주입 수정란의 형질전환율을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 미세주입 수정란의 발현율이 100, 75, 50, 33, 25 및 12.5%인 것이 29.1, 4.2, 27.1, 2.1, 20.8 및 16.7%로서 100 또는 50% 발현된 수정란의 비율이 높은 경향이였으나 유의차는 인정되지 않았다.

**고 찰**

**Table 1. Effect of *in vitro* production system on the development of *in vitro* fertilized or DNA injected embryos**

<i>In vitro</i> culture system	n	No. (%) of			
		$\geq 2$ cell	8 cell	Blastocyst	
DNA injected	CR1aa	150	38 <sup>c</sup> (25.3)	5 <sup>c</sup> ( 3.3)	4 <sup>b</sup> ( 2.7)
	IVMD	175	54 <sup>c</sup> (31.0)	27 <sup>b</sup> (15.5)	4 <sup>b</sup> ( 2.3)
	Total	325	92 <sup>1</sup> (28.3)	32 <sup>1</sup> ( 9.8)	8 <sup>1</sup> ( 2.5)
<i>In vitro</i> fertilized	CR1aa	252	160 <sup>b</sup> (63.5)	54 <sup>b</sup> (21.4)	58 <sup>a</sup> (23.0)
	IVMD	165	126 <sup>a</sup> (76.4)	65 <sup>a</sup> (39.4)	39 <sup>a</sup> (23.6)
	Total	417	286 <sup>2</sup> (68.6)	119 <sup>2</sup> (28.5)	97 <sup>2</sup> (23.3)

<sup>1,2</sup>: a,b,c: Values within column with different superscript differ( $P < 0.05$ ).

**Table 2. Effect of DNA concentration on the development of microinjected bovine embryos**

Concentration (ng/uL)	n	No. (%) of		
		$\geq 2$ cell	8 cell	Blastocyst
2	122	66 <sup>a</sup> (54.1)	26 <sup>a</sup> (21.3)	10 (8.2)
4	137	39 <sup>b</sup> (28.5)	20 <sup>a</sup> (14.6)	4 (2.9)
8	104	30 <sup>b</sup> (28.8)	6 <sup>b</sup> ( 5.8)	0 (0.0)

<sup>a,b</sup>: Values within column with different superscript differ( $P < 0.05$ ).

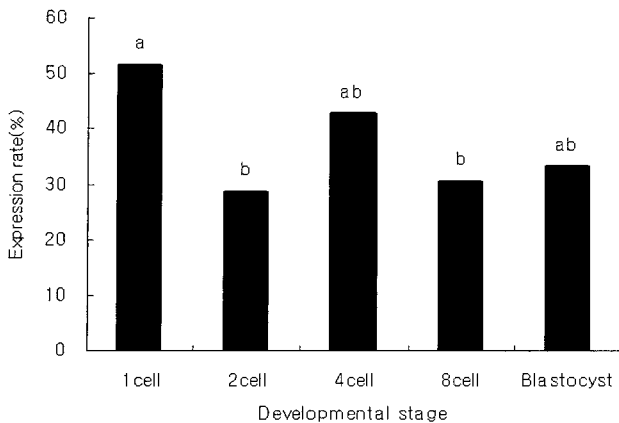


Fig. 3. Transgenic rate of individual embryos with regard to cell cycle. <sup>ab</sup>: Values within column with different superscript differ ( $P < 0.05$ ).

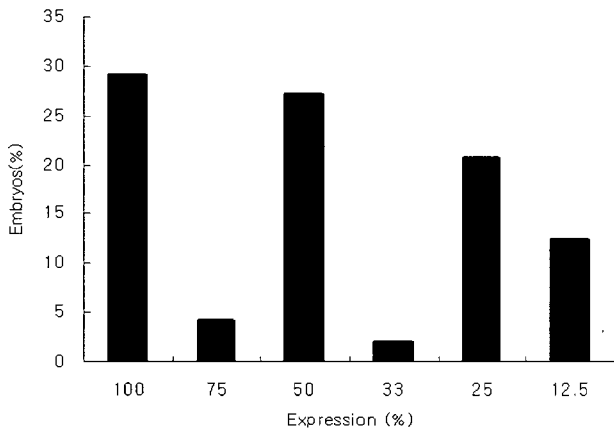


Fig. 4. Distribution of embryos according to transgenic rate.

본 연구에서는 배양 체계가 체외수정 및 미세주입된 수정란의 발달에 대한 효과와 미세주입에 사용하는 유전자의 양 및 유전자 미세주입 수정란에서 GFP 유전자의 발현 양상을 검토하였다.

외래 유전자를 genome 내에 주입하는 방법인 미세주입법이 mouse를 비롯한 실험동물에서는 체계화 되어 있으나, 이 기술을 이용하여 여러 가지 생물학적 또는 의학적으로 사용 가능한 물질을 대량 생산하려면 가축에 적용이 가능해야 한다(Brinster 등, 1985; Wall, 1996). 그러나 재조합된 유전자를 수정된 난자의 응성전핵에 미세주입은 해결해야 할 여러 가지 문제점이 있다. 재조합 유전자 종류, 유전자를 포함한 미세주입용 버퍼 및 미세조작 과정에서의 기계적인 영향 등이 배 발달을 감소시켰다(Peura 등, 1995). 한편 형광 유전자를 이용하는 경우에는 형광 현미경하에서 수정란을 관찰하는 것도 유해하게 작용한다(Murakami 등, 1999). 그리고 이용하는 유전자 농도, 유전자 repair system 및 표적 세포에서의 replication과 transcription에도 영향을 받는다(Wall, 1997).

각종 수정란 생산의 효율성과 품질을 향상시키기 위해서 배양용 배지 개발에 많은 연구가 진행되어 무혈청 배지가 개발되었다(Hochi, 2003; Im 등, 2004). Im 등(2004)은 무혈청 배지인 IVMD101에서 배반포 도달율이 혈청 배지인

TCM199에 비해서 높았고, 동결 용해 후 배반포의 생존율과 세포수도 많았다. 김 등(2001)은 배양에 이용한 혈청 배지의 종류(TCM199 및 CR1aa)에 따른 미세주입 수정란의 발생율은 유사하였으나, L-ascroic acid 및  $\alpha$ -tocopherol의 첨가로 배 발달율이 향상되었다. 본 연구에서는 배지의 종류에 따른 체외수정 및 미세주입 수정란의 각각 배반포 도달율은 비슷한 경향으로 Im 등(2004)과는 상이 하였다. 그러나 무혈청 배지인 IVMD101군의 8세포기 도달율이 유의하게 높은 경향인 것은 이 배양체계를 개선한다면 미세주입 수정란의 배양에 효과적으로 사용할 수 있을 것이다. 한편 배 발달율은 Murakami 등(1999)과 본 연구에서 미세주입 수정란의 배반포 도달율이 체외수정란에 비하여 낮았다. 이와 같은 결과는 미세주입시 난자에 가해지는 물리·화학적 자극 때문일 것이다(Williams 등, 1992).

Menck 등(1998) 및 Nottle 등(2001)은 수정란에 미세주입 하는 유전자의 농도가 증가할수록 형질전환율은 향상되었으나, 배 발생율은 반대의 결과였다. Mouse에서 유전자의 농도가 1ng/uL 이하에서는 농도 증가로 형질전환율이 증가하였으나, 1ng/uL 이상에서는 농도 증가에 따른 차이가 없었다(Brinster 등, 1985; Nottle 등, 2001). 본 연구에서는 2ng/uL 농도의 배반포 도달율이 4ng/uL 이상에 비하여 높은 경향으로 Menck 등(1998)과 유사하였다. 한편 전체적인 발생율은 이전의 연구보다 낮았으나, 배반포 단계에서 형광 발현율은 본 연구가 높은 경향이였다(Menck 등, 1998; Han 등, 1997; Takada 등, 1997). 따라서 형질전환 소 생산에 이용하는 유전자의 양은 발현율과 배 발생을 동시에 보장할 수 있는 적정 농도의 검토가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

가축은 세대간격이 길고 생산과 유지에 많은 비용이 소요되기 때문에 미세주입 수정란의 mosaicism은 생산성 저하를 유발한다(Wall and Seidel, 1992; Wall, 1997). Palmer 등(1984)이 형질전환을 mice에서 시도하여 생산된 산자가 mosaicism이라는 것을 처음으로 보고하였고, 이후 여러 동물에서도 보고가 되었다(Krimpenfort 등, 1991; Wall and Seidel, 1992; Cousens 등, 1994; Wall, 1997; Chan 등, 1999). 미세주입한 DNA가 100% 발현된 수정란의 비율이 총 1~14.7%이고 배반포 단계에서는 25~33%였다(Chan 등, 1999; Murakami 등, 1999; Wang 등, 2001). 본 연구에서는 주입한 DNA가 발현된 수정란의 비율이 총 29.1%로서 이전의 연구보다 높은 경향이였으나, 배반포 단계에서는 33%로서 비슷하였다. Cousens 등(1994) 및 본 연구에서는 미세주입한 DNA의 발현 양상이 배 발달 단계가 진행될수록 낮아지는 경향이였으나, Wang 등(2001)은 반대의 경향이였다.

미세주입법을 이용한 형질전환 소의 생산 효율성을 향상시키기 위해서는 무혈청 배지를 이용하는 배양체계와 주입하는 유전자 종류에 따른 각각의 주입량에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

#### Effects of *In Vitro* Culture Systems on the Development of *In Vitro* Fertilized or DNA-Microinjected Embryos

Y. S. Park and K. S. Min

Kyungbuk Livestock Research Institute

ABSTRACT

This experiment was conducted to investigate effects of the two different *in vitro* production systems, serum-containing system (IVM, IVF and IVC; TCM199, TALP and CR1aa) and serum-free system (IVM, IVF and IVC; IVMD101, IVF100 and IVMD101), on the development of *in vitro* fertilized or DNA-microinjected embryos. We also examined the effect of DNA dosage and its expression pattern in embryos. The DNA used for microinjection was a green fluorescence protein gene. The development rates to  $\geq 2$ cell, 8cell and blastocyst stage were significantly higher *in vitro* fertilized embryos than those in DNA-microinjected embryos. The development rate to the 8-cell stage was significantly higher in serum-free system than in serum-containing system ( $p < 0.05$ ; 3.3% vs. 15.5% and 21.4% vs. 39.4%, respectively). The development rates to the blastocyst stage of *in vitro* fertilized or DNA-microinjected embryos between two different culture system (2.7% vs. 2.3% and 23.0% vs. 23.6%, respectively) were not different. The development rates of embryos injected 2 ng/uL DNA was higher than those of embryos injected 4 or 8 ng/uL DNA. The GFP expression rate of 1-cell embryos was significantly higher than that of 2-cell and 4-cell embryos, whereas the rates were not different between 4-cell and blastocyst-stage embryos.

(Key words : Bovine, Microinjection, GFP)

## 인용문헌

- Behboodi E, Groen W, Destrempes MM, Williams JL, Ohlrichs C, Gavin WG, Broek DM, Ziomek CA, Faber DC, Meade HM, Echelard Y (2001): Transgenic production from *in vivo*-derived embryos: Effect on calf birth weight and sex ratio. *Mol Reprod Dev* 60:27-37.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD (1985): Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci* 82:4438-4442.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Chan AWS, Kukulj G, Skalka AM, Bremel RD (1997): Expression of green fluorescence protein in mammalian embryos: a novel reporter gene for the study of transgenesis and embryo development. *Theriogenology* 47:222.
- Chan AWS, Kukulj G, Skalka AM, Bremel RD (1999): Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol Reprod Dev* 52: 406-413.
- Cousens C, Carver AS, Wilmut I, Colman A, Garner I, O'Neill GT (1994): Use of PCR-based methods for selection of integrated transgenes in preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 39:384-391.
- Devgan V, Seshagiri PB (2003): Successful development of viable blastocysts from enhanced green fluorescent protein transgene-microinjected mouse embryos: Comparison of culture media. *Mol Reprod Dev* 65:269-277.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, 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. *Bio/Technology* 9:835-838.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pig by microinjection. *Nature* 315:680-683.
- Han YM, Park JS, Ryoo ZY, Kim YH, Lee KS, Yang CS, Lee KK (1997): Improved developmental rate of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblasts. *Theriogenology* 47:223.
- Hill KG, Curry J, DeMayo FJ, Diller KJ, Slapak JR, Bondioli KR (1992): Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Theriogenology* 37:222.
- Hochi H (2003): *In vitro* production of bovine embryos and the application for embryo transfer. *Theriogenology* 59:675-685.
- Im YJ, Kim JH, Song HB, Jung YG (2004): Transfer, cryopreservation and production of bovine embryos cultured in serum-free system. *Korean J Emb Trans* 19:133-145.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, de Boer H (1991): Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Bio/Technology* 9:844-847.
- Krishner RL, Gibbons JR, Canseco RS, Johnson JL (1994): Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Research* 3:226(abstract).
- Lin TP (1966): Microinjection of mouse egg. *Science* 151:333-337.
- Menck MC, Mercier Y, Champion E, Lobo RB, Heymen Y, Renard JP, Thompson EM (1998): Prediction of transgene integration by noninvasive bioluminescent screening of microinjected bovine embryos. *Transgenic Research* 7:331-341.
- Min KS, Hiyama T, Seong HH, Hattori N, Tanaka S, Shiota K (2004): Biological activities of tethered chorionic gonadotropin (eCG) and its deglycosylated mutants. *J Reprod Dev* 50: 297-304.
- Murakami M, Fahrudin M, Varisanga MD, Suzuki T (1999): Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. *J Vet Med Sci* 61:843-847.
- Nottle MB, Haskard KA, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlfatrick SM, Ashman RJ, Harrison SJ, Barlow

- SJ, Barlow H, Wigley PL, Lyons IG, Cowan PJ, Crawford RJ, Tolstoshev PL, Pearse MJ, Rognis AJ, d'Apice AJF (2001): Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Research* 10:523-531.
21. Palmiter RD, Wilkie TM, First NL (1984): Transmission distortion and mosaicism in and unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 36:869-877.
  22. Peura TT, Tolvanen M, Hyttinen JM, Janne J (1995): Effects of membrane piercing and the type of pronuclear injection fluid on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 43:1987-1096.
  23. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM (1999): Transgenic milk as a method of production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods* 231:147-157.
  24. Prasher DC (1995): Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11:320-323.
  25. Rexroad CE, Hammer RE, Bolt DJ, Mayo KE, Frohman LA, Palmiter RD, Brinster RL (1989): Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol Reprod Dev* 1:164-169.
  26. Rieth A, Pothier F, Gagne M, Sirard MA (1999): Use of bovine satellite sequences to increase transgene integration by homologous recombination in bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 53:1-7.
  27. Takakda T, Lida K, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S, Tsujimoto G (1997): Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat Biotechnol* 15: 458-461.
  28. Wall RJ (1996): Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57-68.
  29. Wall RJ (1997): A new lease on life for transgenic livestock. *Nat Biotechnol* 15:416-417.
  30. Wall RJ, Seidel G Jr (1992): Transgenic farm animals-A critical analysis. *Theriogenology* 38:337-357.
  31. Wang B, Lazaris A, Lindenbaum M, Stewart S, Co D, Perez C, Drayer J, Karatzas CN (2001): Expression of a reporter gene after microinjection of mammalian artificial chromosomes into pronuclei of bovine zygotes. *Mol Reprod Dev* 60:433-438.
  32. Williams BL, Johnson AE, Velandar WH, Page RL, Drohan WN, Young JM, Person RE, Wilkins TD, Gwazdauskas FC (1992): *In vitro* development of zygotes from prepubertal gilt after microinjection of DNA. *J Anim Sci* 70:2207-2211.
  33. 김은국, 강만중, 문승주 (2001): DNA 미세현미 주입 한우 수정란의 체외 발달. *한국수정란이식학회지* 16:73-78.
- (접수일자: 2005. 9. 2. / 채택일자: 2005. 9. 15.)