

돼지 태아 섬유아 세포의 효과적인 배양

김혜민 · 이상미 · 박효영 · 문승주 · 강만중[†]

전남대학교 농업생명과학대학, 농업과학기술연구소, 동물자원학부

Efficient Culture of Porcine Fetal Fibroblasts

H. M. Kim, S. M. Lee, H. Y. Park, S. J. Moon and M. J. Kang[†]

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University

SUMMARY

Culture method of somatic cells is one of the important factors in the production of transgenic pigs by somatic cell nuclear transfer. In this study, we established an efficient culture method of porcine fetal fibroblasts. Porcine fetal fibroblasts were isolated from 33-day-old fetuses. The proliferation of porcine fetal fibroblasts was analyzed by different serum types and culture media. The cultures in medium supplied 15% ES screened FBS showed faster increase in cell number than 15% FBS. Also, fetal fibroblasts have been propagated continuously for 7~8 passages in ES modified DMEM and DMEM medium. We transfected PGK-neo^r vector (pKJ2) into porcine fetal fibroblasts to estimate colony formation in this culture condition. The formation of colonies was confirmed in the medium containing 300 μ g/ml G418 at 12 day. These data show that this culture system can be used screening of porcine somatic cells transfected transgene.

(Key words : cell culture, porcine, transfection, fetal fibroblast)

서 론

체세포를 이용한 복제 동물이 1997년 Wilmut 등에 의하여 보고된 후에 다양한 동물에서도 복제 동물이 탄생하고 있다. 이러한 복제 동물을 생산하는 Nuclear transfer 방법은 형질 전환 동물을 생산하는 효과적인 방법으로 이용되고 있으며(Cibelli 등, 1998; Schnieke 등, 1997), 최근에는 nuclear transfer 방법을 이용하여 α -1,3-galactosyltransferase 유전자가 knock-out 된 돼지의 생산도 보고되고 있다(Lai 등, 2002). 복제 동물의 생산에는 mammary gland cell(Wilmut 등, 1997), ear fibroblast (Park 등, 2002), cumulus cell(Cheong 등, 2000), fetal fibroblast(Boquest 등, 2002)등과 같이 다양한 체세포의 이용이 보고되고 있다(Kato 등, 2000). 현재 nuclear transfer에 이용되는 체세포의 배양에는 Ham's F10(Lai 등, 2002), DMEM(Cheong 등, 2002; Lai 등, 2002b), DMEM/F-12(Mir와 Piedrahita, 2004) 등이 이용되고 있으며, 사용되는 혈청의 농도도 10~20%를 사용하고 있다. 또한, nuclear transfer에 이용되는 세포의 계대 회수도 복제 동물 생산에 영향을 미치는 것으로 보고하고 있다(Kubota 등, 2000). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 자발

적으로 immortalize된 유선상피 세포주 또는 telomerase에 의하여 immortalize된 섬유아 세포주 등을 이용한 복제도 시도되고 있다(Cui 등, 2003; Zakhartchenko 등, 1999).

이와 같은 nuclear transfer 방법에 의한 복제 동물 생산은 형질 전환 동물을 생산하는 매우 효율적인 방법으로 이용될 수 있다. Nuclear transfer 법에 의한 복제 동물 생산 방법을 형질전환 동물 생산에 이용하게 되면 체세포에 발현시키고자 하는 벡터 또는 gene targeting 하고자 하는 벡터를 도입하고, 이들 벡터가 도입된 세포만을 선별하여 nuclear transfer에 이용할 수 있으므로 고전적인 미세주입 방법보다는 효율적으로 형질 전환 동물을 생산할 수 있다(Cibelli 등, 1998; Lai 등, 2002; Park 등 2002). 그러나 이와 같은 nuclear transfer 방법에 의하여 형질 전환 복제 동물을 생산하기 위해서는 이들 체세포에 발현 벡터를 도입하고 선별하는 시간이 필요하며, 특히 복제에 이용되기 전까지 안정적으로 세포가 배양되는 것이 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 돼지 태아 섬유아 세포의 배양 조건을 검증하기 위하여 혈청의 종류, 배양액의 종류 등을 선정하고 유전자가 도입된 체세포를 선별 가능한지 검토하였다.

¹ 본 연구는 농진청 바이오그린 사업(과제번호: 20070101034009) 지원으로 이루어진 것임.

[†] Correspondence : E-mail : mjkgang@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

1. 돼지 태아 섬유아세포의 분리 배양 및 세포주기 분석

돼지 태아 섬유아세포는 랜드레이스(암컷)×요크셔(수컷)의 F1 암컷 임신 33일째 태아로부터 다음과 같이 제조하였다. 임신돈을 도살하여 자궁을 도려내어 10분 이내에 실험실로 운반하였고, 태아는 무균상내에서 자궁으로부터 분리하였으며, 항생제가 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척된 태아를 petridish에 옮겨 놓고 태아의 머리, 심장, 간, 내장 등(많은 혈액을 포함하는 부분)을 도려낸 후 나머지 부분만 새로운 petridish에 옮겨 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 PBS로 2~3회 세척한 후 안과용 가위를 이용하여 매우 잘게 절단하였다. 절단된 태아를 18 ml의 EDTA-PBS로 suspension한 다음 멸균된 100 ml 병으로 옮겨 2 ml의 0.5% trypsin을 넣고 37°C에서 20~30분 동안 가끔 병을 흔들어 주면서 배양하였다. 배양 후 10% FBS를 포함하는 DMEM을 넣어 trypsin을 불활성화한 다음 50 ml tube로 세포 현탁액을 옮겨 5분간 정지시킨 후 상층만 새로운 tube로 옮겼다. 회수된 상층은 800~1,000 rpm, 10분 원심분리하여 세포를 회수하였으며, 새로운 medium으로 suspension한 후 세포 수를 측정한다. 다음 10cm culture dish에 7×10^6 cell/10 ml culture medium을 접종하여 배양하였다. 배양 다음날 새로운 medium으로 교환하여 부착하지 않은 세포를 제거한 다음 2~3일 배양하여 confluent 하게 자라면 10% DMSO를 포함하는 배양액을 동결 보존액으로 이용하여 세포를 동결 보존하였다.

돼지 태아 섬유아 세포의 세포주기 분석은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 분석을 위해, 세포를 1.5×10^5 cell로 35 mm culture dish에 접종하였다. 배양 24시간 후 세포를 0.1% trypsin 처리하여 회수하였고, 회수된 세포는 5×10^5 cell씩 15 ml conical tube로 옮겨 1,500 rpm, 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 회수된 세포는 1×PBS로 wash 후 70% ethanol을 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 1,500 rpm, 5분간 원심 분리 후 70% ethanol을 제거하였다. 다시 한번 1×PBS로 세포를 wash하고 500 µl propidium iodide staining solution (20 µg/ml propidium iodide, 30 µg/ml RNase A, 0.2% Triton X-100)을 첨가하여 37°C에서 30분간 방치 후 Beckman Coulter-cytomics FC500 장치를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

2. 혈청 종류 및 농도에 따른 태아 섬유아 세포의 증식 효율 확인

혈청 농도에 따른 돼지 태아 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 돼지 태아 세포를 6 cm dish에 1×10^5 cell로 접종하였다. 증식 여부는 24시간 간격으로 6일간 세포 수를 측정하여 확인하였다. 배양액은 각각 10%, 15%, 20%

fetal bovine serum(FBS, Hyclon, USA)를 포함하는 DMEM (WelGene, Korea)을 이용하였다.

혈청 종류에 따른 태아 섬유아세포의 증식률을 확인하기 위하여, 돼지 태아 섬유아 세포를 15% FBS(Hyclon, USA)가 첨가된 DMEM/F-12(WelGene, Korea) 배지에 용해하였다. 3일 후 confluent한 상태가 되면 세포를 5×10^5 cell/100 mm dish 3장에 배양하였다. 다음날 각각 100 mm dish마다 15% A FBS (ES screened FBS, Hyclon, USA), 15% B FBS(Hyclon, USA), 15% C FBS(TerraCell, Canada)가 첨가된 DMEM/F-12(WelGene, Korea) 배지로 교체하였다. 2일 후 cell 수 측정을 위해 각 혈청 조건마다 1.2×10^5 cell/60 mm dish에 9장씩 배양하였고, 배양 24시간, 48시간, 72시간 후 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

3. 세포배양 배지 종류에 따른 태아 섬유아세포의 증식 효율 확인

배지 종류에 따른 fetal fibroblast의 증식률을 확인하기 위하여, Porcine fetal fibroblast를 15% FBS(Hyclon, USA)가 첨가된 DMEM(WelGene, Korea) 배지에 용해하였다. 3일 후 confluent한 상태가 되면 세포를 5×10^5 cell/100mm dish로 3장에 배양하였다. 다음날 각 culture dish마다 각각 종류가 다른 3가지 배지로 교체하였다. 첫째는 15% FBS(Hyclon, USA)가 첨가된 DMEM/F-12 배지, 둘째는 15% FBS(Hyclon, USA)가 첨가된 DMEM(WelGene, Korea) 배지, 셋째는 15% FBS(Hyclon, USA), 1×non-essential amino acid(WelGene, Korea), 1×sodium pyruvate(WelGene, Korea), 10^{-4} M β-mercaptoethanol (Sigma, USA)이 첨가된 DMEM(WelGene, Korea) 배지로 교체하였다. 2일 후 confluent한 상태가 되면 각 배지 조건마다 5×10^5 cell/100 mm dish 1장, 9×10^4 cell/35 mm dish 5장씩 배양하였다. 3일 후 100 mm dish에 배양한 세포는 다시 5×10^5 cell/100 mm dish 1장, 9×10^4 cell/35 mm dish 5장씩 접종하고, 3일 후 35 mm dish에 배양된 세포는 crystal violet 염색을 수행하는 것을 반복하여 계대에 따른 세포 증식을 측정하였다. 세포의 증식률은 매 계대 때마다 세포에 crystal violet을 염색한 후 acetic acid 용액에 의해 elution된 crystal violet을 UV spectrometer(OD₆₀₀)를 통해 측정하였다.

4. Neo 유전자가 도입된 세포의 선별

본 실험에서 결정된 태아 섬유아세포의 배양 조건을 이용하여 유전자가 도입된 colony의 선별 가능성을 다음과 같이 실시하였다. 태아 섬유아 세포는 15% FBS(Hyclon, USA)가 첨가된 DMEM(WelGene, Korea) 배지에 용해하여 3일 후 confluent한 상태가 되면, 세포를 1.8×10^5 cell/35 mm dish로 배양하였다. Transfection은 세포 배양 16시간 후 jetPEI™ transfection kit(Polyplus-transfection, France)와 PGK promoter에 의하

여 발현이 유도되는 neomycin resistance gene (pKJ2)를 이용하여 실험 지침서에 따라 실시하였다. Transfection시킨 세포를 100 mm dish로 계대 배양한 후 48시간이 지나면 300 μ g/ml G418이 첨가된 배지를 이용하여 12일간 선별을 수행하였다. G418 저항성에 의해서 형성된 colony는 cloning cylinder를 이용하여 pick up한 후 24-well culture plate로 옮겼다. Pick-up된 colony는 세포의 증식을 위해서 3~4일 간격으로 12-well plate, 6-well plate, 60 mm dish, 100 mm dish로 계대 배양 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 돼지 태아 섬유아 세포의 분리 배양 조건

임신 33일째 태아로부터 trypsin 처리에 의하여 돼지 태아 섬유아 세포를 제조하고 배양한 결과 Fig. 1에 제시한 바와 같이 전형적인 섬유아 세포의 형태를 나타내었다. 이들 세포 주기를 FACS에 의하여 분석한 결과, G1기 44.1%, G2기 10%, S기 45.9%로 나타났으며, S기가 45.9%로 높게 나타난 것은 세포 분열이 활발한 것을 나타내고 있다. 그러나 Boquest 등 (1999)은 분열 중인 돼지 태아 섬유아 세포의 세포 주기를 조사한 결과, G1+G0기 74.1%, S기 7.8%, G2+M기 18.2%로 보고하였다. 이러한 결과의 차이는 배양 중인 세포의 분석 시간의 선정의 차이라고 생각된다.

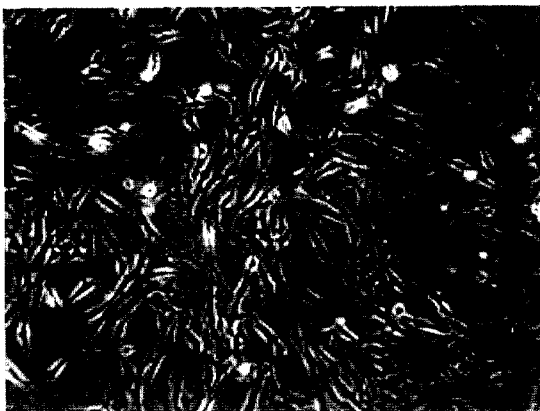
세포 배양에 사용하는 혈청은 성장 인자, 단백질, 호르몬 등 다양한 인자를 세포에 공급하는 것으로 알려져 있으며, 혈청의 종류와 농도는 세포의 종류에 따라 선정 이용되어야 한다(Freshney, 2000). 따라서 본 연구에서는 먼저 혈청 농도가 태아 섬유아 세포의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. Fig.

2A에 나타낸 바와 같이 세포를 접종하고 6일간 배양하면서 세포 수를 측정하여 증식 정도를 확인한 결과, 10%의 혈청에서 전체적으로 낮은 증식율을 나타내었으며, 좋은 증식율을 나타낸 경우는 배양 5일째와 6일째에 20%의 혈청을 사용하였을 때 가장 좋았으나 15%와는 큰 차이는 없었다. 이러한 결과는 일반적으로 돼지 태아의 배양에 15%의 혈청을 사용하는 연구 보고(Park 등, 2001; Lai 등, 2002b)들과 큰 차이가 없는 것으로 생각되며, 돼지 태아 섬유아 세포의 배양에는 15~20%의 혈청을 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

또한, 혈청은 회사에 따라 defined, characterized, standard 등으로 구분되거나 종류가 다양하게 판매되고 있으며, 제조 과정에 따라 endotoxin, hemoglobin 등의 양에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 시판되고 있는 혈청 3종류를 가지고 세포의 증식율을 검토하였다. DMEM/F-12 배지를 기본 배지로 하고, 각 종류 A, B, C의 혈청을 15%씩 첨가하여 증식율을 조사한 결과, A 혈청에서 가장 좋은 증식율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 시판되는 혈청의 종류에 따라 돼지 태아 섬유아 세포의 증식에 영향을 줄 수 있음을 나타낸다(Fig. 2B).

앞에서 선정된 혈청의 종류와 농도를 이용하여 배양 배지에 따른 돼지 태아 섬유아 세포의 증식을 검토하였다. 본 실험에서는 각 배양 조건에서 세포를 5×10^5 cell/100 mm dish로 배양하고, 3일 후 100 mm dish 세포로부터 9×10^4 cell/35 mm dish 5장씩 접종하여 배양하는 방법을 반복하면서 crystal violet 염색을 실시하여 증식율을 조사함과 동시에, 100 mm dish 세포로부터 35 mm dish에 접종할 수 있는 세포수가 회수되지 못하면 다음 계대를 중단하는 것으로 증식 정도를 확인하였다. Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 일반적으로 많이 사용되는

A)



B)

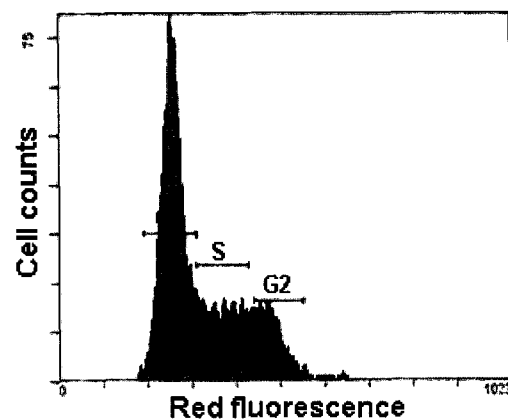


Fig. 1. Cell morphology and cell cycle of porcine fetal fibroblasts. A. Representative cell morphology of porcine fetal fibroblasts (passage 2). B. A histogram of DNA (red fluorescence) obtained using flow cytometry of cultured porcine fetal fibroblasts.

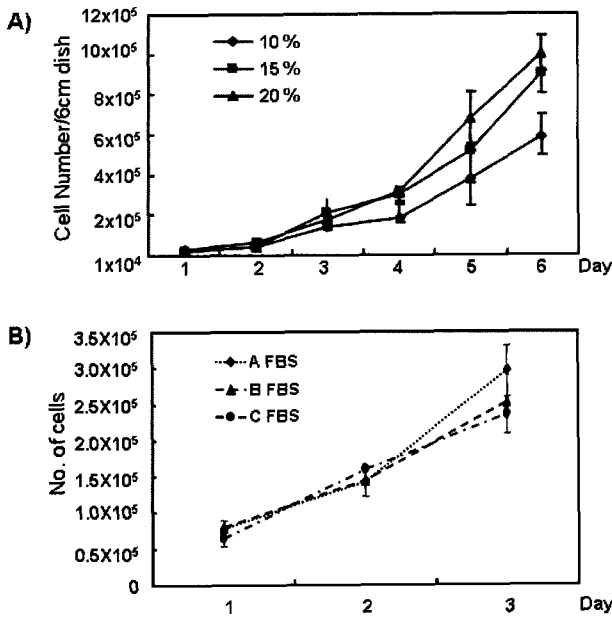


Fig. 2. Proliferation of porcine fetal fibroblasts cultured different FBS concentration and serum types. A. Relative growth rates of porcine fetal fibroblasts grown in 10%, 15% and 20% FBS-DMEM/F12 as determined by cell count every day for 6 day. B. Relative growth rates of porcine fetal fibroblasts grown in A, B and C FBS-DMEM as determined by cell count every day for 3 day. Data shown are mean±SEM (n=3).

DMEM 배지에서가 8번째 계대까지 세포가 유지되었으며, 증식율도 계대에 따라 안정적으로 유지되는 경향을 나타내었다. 그러나 DMEM/F-12 배지에서는 2번째 계대 후에 급격하게 세포의 증식이 낮아져 DMEM과는 많은 차이를 나타내었다. 또한, 생쥐에서 embryonic stem cell을 배양할 때 사용하는 배지를 약간 조정한 배지(ES modified DMEM)를 사용하여 세포를 배양한 경우는 5~6번째 계대까지 다소 안정적이었으나, 8번째 계대부터는 급격하게 증식율이 떨어지는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 돼지 태아 섬유아세포의 배양은 15~20%의 혈청을 포함하는 DMEM 배지를 이용하는 것이 적절한 것으로 생각된다.

2. 돼지 태아 섬유아 세포에 Neo 유전자의 도입 및 세포의 선별
 돼지 태아 섬유아 세포에 벡터를 도입하고 유전자가 도입된 세포를 선별하는 것은 체세포 복제 방법을 이용하여 형질 전환 동물을 생산하는 데 있어서 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 앞에서 확립된 돼지 태아 섬유아 세포의 배양 조건에서 neo 유전자를 세포에 도입하여 선별 가능한지를 확인하였다. 본 연구에서는 neo 유전자를 도입하고 G418로 선별을 시작한 후 7~8일경부터 colony를 확인할 수 있었으며, 11~12일경에 pick up 가능한 크기까지 증식하였다(Fig. 4A).

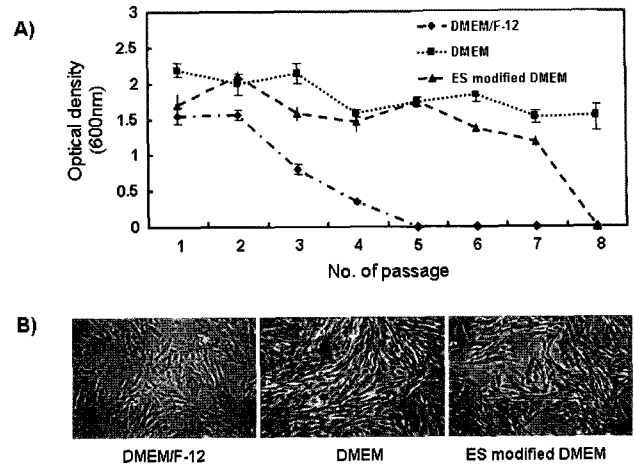


Fig. 3. Proliferation of porcine fetal fibroblasts by three kinds of culture media. A. Relative growth rates of porcine fetal fibroblasts grown in DMEM/F12, DMEM, and ES modified DMEM as determined by crystal violet solution. B. Cell morphology of porcine fetal fibroblasts at 4 passage stained by crystal violet solution. Data shown are mean±SEM (n=3).

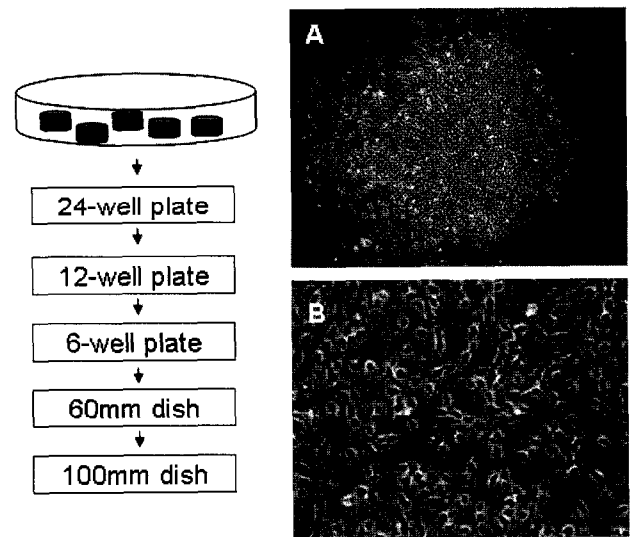


Fig. 4. Colony (A) and cell (B) morphology of porcine fetal fibroblasts transfected neo gene.

이러한 colony는 cloning cylinder를 이용하여 세포를 24 well plate로 옮겼으며, 3~4일 간격으로 12 well, 6 well, 60 mm dish, 100 mm dish로 세포를 계대 배양하였다. 이렇게 계대 배양된 세포는 Fig. 4B에 나타난 바와 같이 전형적인 섬유아 세포의 형태를 나타내었다. Kuhholzer 등(2000)은 20% 혈청이 포함된 Ham's F10 배지를 이용하여 돼지 태아 섬유아 세포에 aminoglycoside phosphotransferase 유전자를 도입하고

400 $\mu\text{g/ml}$ G418로 13일간 처리하여 유전자가 도입된 세포를 선별하였다고 보고하고 있다. 그리고 Lai 등(2002a)도 alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs를 생산하기 위하여 돼지 태아 섬유아 세포에 벡터를 도입하고 G418 선별 후 14일째에 세포를 계대 배양한 것으로 보고하고 있다. 그러나 본 연구의 배양 방법으로는 다소 빠른 12일째에 colony를 pick up할 수 있었다.

본 연구 결과를 종합하여 보면 돼지 태아 섬유아 세포의 배양에는 15~20%의 혈청을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하는 것이 보다 효율적이며 이 배양 조건에서 벡터를 도입하고 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 12일간 처리하는 것이 유전자가 도입된 세포를 선별할 수 있는 좋은 조건임을 제시하고 있다. 이와 같은 연구 결과는 유전자가 도입된 돼지 태아 섬유아 세포의 확보에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

체세포의 배양 방법은 체세포 핵이식에 의한 형질 전환 돼지 생산에 있어서 중요한 요인 중 하나이다. 본 연구에서는 돼지 태아 섬유 아세포의 효율적인 배양 방법을 수립하였다. 돼지 태아 섬유 아세포는 임신 33일째 태아로부터 제조하였으며, 돼지 태아 섬유아세포의 증식을 혈청과 배지 종류별로 분석하였다. 그 결과, 15% ES screened FBS가 포함된 DMEM 배지에서의 배양은 15% FBS보다 세포수의 증가가 훨씬 더 빠르게 나타났다. 또한, 태아 섬유아 세포는 DMEM/F-12와 다르게 ES midified DMEM과 DMEM 배지에서 7~8번째 계대까지 증식이 유지되었다. 이러한 배양 조건에서 PGK-neo 벡터 (pKJ2)를 돼지 태아 섬유아 세포에 도입한 다음 12일간 300 $\mu\text{g/ml}$ G418이 포함된 배지에서 선별하여 colony를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에 이용된 배양 시스템이 transgenic vector를 도입시킨 돼지 체세포의 screening에 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

참고문헌

- Boquest AC, Day BN and Prather RS. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 60:1013-1019.
- Boquest AC, Grupen CG, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, d'Apice AJ and Nottle MB. 2002. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 66:1283-1287.
- Cheong HT, Ikeda K, Martinez Diaz MA, Katagiri S and Takahashi Y. 2000. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12:15-20.
- Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN and Prather RS. 2002. Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:488-492.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
- Cui W, Wylie D, Aslam S, Dinnyes A, King T, Wilmut I and Clark AJ. 2003. Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol. Reprod.*, 69:15-21.
- Freshney RI. 2000. Culture of animal cells; a manual of basic technique. 4th ed., Wiley-Liss, New York, pp. 99-103.
- Kato Y, Tani T and Tsunoda Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 120:231-237.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M and Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:990-995.
- Kuhholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day BN and Prather RS. 2000. Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 56:145-148.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ and Prather RS. 2002a. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002a 295:1089-1092.
- Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB and Prather RS. 2002b. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 62:300-306.
- Mir B and Piedrahita JA. 2004. Nuclear localization signal and cell synchrony enhance gene targeting efficiency in primary fetal fibroblasts. *Nucleic Acids Res.*, 32:e25.
- Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kuhholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB and Prather RS. 2001. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein.

- Anim. Biotechnol., 12:173-181.
- Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB and Prather RS. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol. Reprod.*, 66:1001-1005.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
- Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prella K, Schernthaner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G and Wolf E. 1999. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol. Reprod. Dev.*, 54:264-272.
-

(접수일: 2007. 9. 8 / 채택일: 2007. 9. 19)