

한국재래 흑염소 수정란의 이식:
형질전환 흑염소 생산을 위한 수정란의 채취와 이식

신 상 태
충남대학교 수의과대학

Embryo transfer in Korean Native Black Goat: Embryo
recovery and transfer for the production of transgenic goat

Shin, Sang Tae
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University,
Daejeon, 305-764, Republic of Korea

ABSTRACT

During the last three decades considerable advances has been made in goat embryo production and transfer technology. The Korean native black goat is the most useful domestic ruminant in this country for biological investigation and application because it has a lot of merits such as relatively short generation period (1 vs 2 year for a cow), easy of handling, well adaptation, high fertility, convenient and inexpensive.

This article covers the methods of superovulation, estrus synchronization, embryo collection and transfer techniques, pregnancy diagnosis and subsequent pregnancy and kidding rates for the production of transgenic Korean native black goats. More than one hundred goat kids have been produced as a result of our transgenic goat project via microinjection of foreign gene into pronuclei, in vitro culture, transfer of various stages of fresh and frozen-thawed microinjected embryos into oviducts or uteri of recipient does. We have got two transgenic goats carrying a transgene targeting the expression of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) to the mammary gland so far.

Since collection and transfer of embryos in this species is usually accomplished by laparotomy, exteriorization of the reproductive tract for surgical embryo collection leads to the formation of post-operative adhesions. Nonsurgical or laparoscopic technique to reduce adhesions from repeated surgeries has great advantages in improving embryo production and transfer especially from valuable donors. We will discuss this later.

1. 서 론

소형 반추 동물인 염소에서 수정란이식은 그 경제성과 기술적인 한계(수술적 방법)로 인해 소나 실험동물에서와는 달리 그다지 활성화되지 못했었다. 그러나 최근 형질전환 동물에 대한 전세계적인 관심과 유선 조직이 유용 유전인자의 발현 시스템으로써 가장 확실하고 효과적인 방법임이 알려지면서 (Maga & Murray, 1995), 염소는 그 자체로서 또는 소에 적용하기 전 단계의 실험 동물로서 각광을 받는 주요한 수정란이식 대상 동물이 되었다.

Baguisi 등(1999)은 젖 염소 (dairy goat)는 치료용 재조합 단백질을 생산할 수 있는 최고의 형질전환 동물로써, 이미 여러 동물 모델에서 확인된 바와 같이 재조합 단백질의 생산가능성은 젖 1ℓ 당 1~5 g정도이며, 따라서 소규모의 형질전환 염소목장 단 하나만으로도 연간 1~300 kg의 정제된 제품을 손쉽게 얻을 수 있다고 하였다.

재조합 유전자를 이용하여 형질전환 동물을 생산하는 방법으로는 pronuclear microinjection (Hammer et al 1985, Ebert et al 1991, Wang et al 1996), nuclear transfer (Schnieke et al 1997, Baguisi et al 1999), Retroviral infection (Haskel & Bowen 1995), sperm-mediated (Lavitano et al 1989, 1997) 등의 여러 가지가 있으나, 현재로서는 pronuclear microinjection 법이 형질전환 염소를 만들 수 있는 가장 확실한 방법으로 알려져 있다 (Baguisi et al 1999).

한국 재래 흑염소는 토착 동물로서 우리 나라의 환경에 잘 적응하고, 사양 관리가 매우 쉽고 비용이 적게 들며, 구입이 용이하다. 더욱이 크기가 작고 체중이 가벼워 취급하기가 쉬우며, 번식이 잘 되고, 비교적 다량의 젖을 생산함은 물론, 소 (9개월)에 비해 임신 기간이 짧아 (5개월) 형질전환 동물 제조 등 실험용 반추수로서 우수한 장점을 지니고 있다.

한국 재래 흑염소의 번식과 수정란 이식에 연구는 1980년대 초에서 1990년대 초까지 경상대학교 등에서 집중적으로 이루어 졌다 (송 등 1984, 1985, 박 등 1989, 1991). 그러나 이들 연구는 대부분 발정 주거나 동기화 또는 상실배 이상의 수정란의 채취와 이식 및 조작 등에 관한 것이었으며, 초기 수정란의 이식에 관한 논문은 드물다 (나 등 1987).

본 연제에서는 pronuclear microinjection 방법을 통한 형질전환 흑염소 생산에 필요한 전핵 단계의 한국 재래 흑염소 수정란을 채취하기 위한 공란 흑염소의 과배란 처리, 수란 흑염소의 발정동기화, 그리고 여러 발육 단계의 흑염소 수정란의 이식과 임신 진단 등에 관해 간략히 기술하고, 수정란 이식 방법과 그 결과

를 제시함으로써 우리의 우수한 동물 자원인 한국 재래 흑염소의 활용도와 수익성을 높이고자 한다.

2. 발정 동기화 및 과배란 처리

수정란의 채취 및 이식에 사용할 암컷 흑염소는 최소한 생후 8개월령 이상 그리고 체중 10 kg 이상이어야 된다. 이 기준에 미달되는 염소를 구입하게 되면 환경에 잘 적응하지 못해 호흡기 또는 소화기 질병에 걸리기 쉽고 발육부진 등으로 인해 폐사되는 경우가 많아 실험에 곤란을 겪기가 쉽다. 생후 일년령 이상 체중 15 kg 이상의 염소를 사용하면 사양 관리가 쉽고 훨씬 좋은 결과를 얻을 수 있다.

염소의 발정동기화를 위해서는 $PGF_{2\alpha}$ 나 (Baril et al 1996), progesterone을 투여하는 방법들이 있지만, 전자는 투여 당시 난소에 활동성 황체가 존재하는 염소에서만 이용 가능하므로 무작위의 다수 염소에 대한 투여효과가 불확실하기 때문에 후자가 주로 이용된다. 현재 상품화되어 있는 progesterone제제로서는 60 mg의 medroxyprogesterone acetate가 함유된 질내 삽입 스폰지인 MAP (Veramix[®], Upjohn), 6.0 mg의 norgestomet이 함유된 earplant (Synchro-Mate-B[®], Rhone Merieux) 및 0.3 g의 progesterone이 함유된 질 삽입 기구인 silicone rubber matrix (CIDR[®], InterAg)가 있다 (Bretzlaff et al 1989, 1991, Bongso et al 1982, Rubianes et al 1997). 이들은 공히 질내 또는 피하에 12~14 일간 삽입하였다가 제거하며 경우에 따라 eCG 또는 hCG를 병용한다. 최근 전자의 두 제품은 생산 또는 공급이 중단되어 사용할 수가 없게 되었지만, 다행히도 CIDR는 구입이 가능하고 (판매 회사: 버박코리아[®]), 양과 염소 전용의 소형이 있어 편리하며 그 효능도 믿을 만하다.

공란 염소의 과배란을 위해서 과거에는 PMSG (or eCG)를 주로 사용하였으나 (Bongso et al 1982), Table 1에서 보는 바와 같이 FSH 단독 투여나 $PGF_{2\alpha}$ 와의 병용 투여는 progesterone 삽입 기구와 FSH의 병용 투여에 비해 발정동기화 및 배란율에 심한 차이가 있으므로, 대부분이 FSH를 progesterone 삽입 기구와 같이 사용한다 (Bondili 1981, Amstrong et al 1983). FSH는 통상 1일 2회, 4일간 연속으로 점감법 (4, 3, 2, 1 mg) (Selgrath et al 1990, 신 등 1982) 또는 동량 (Gootwine et al 1997)으로 투여한다.

Table 1. The results of superovulatin and estrus induction

Treatment	No. of goats	Estrus induction	No. of ovulation points
FSH only	7	3/7	5.43 ± 3.56
PGF _{2α} + FSH	7	5/7	4.43 ± 1.81
MAP + FSH	7	7/7	11.43 ± 1.70

발정동기화 또는 과배란 처리된 염소들은 progesterone 삽입기구 제거 후 24~48시간 사이에 발정 증상을 보인다. 과배란 처리된 공란 흑염소는 수정률을 높이기 위하여 progesterone 제거 후 24시간에 수정능력이 확인된 수컷과 합사시켜 교미가 이루어지는 것을 일단 확인한 다음 하루 밤을 동거시킨다.

일반적으로 GnRH나 hCG는 배란율을 높이는 작용이 있다고 보고 되어 있다 (Robin et al 1994). Krisher et al (1994)은 Nubian종을 이용한 과배란 시험에서 GnRH를 투여하여 평균배란점을 약 5개(GnRH 비투여군)에서 약 18개(GnRH 50 µg투여시)까지 높일 수 있었다고 보고하였다. 그러나 재래 흑염소를 이용한 과배란 처리에서 GnRH의 투여 후 48시간만에 회복하여 배란점을 확인한 결과, 투여량이나 투여 유무가 과배란처리 중인 공란흑염소의 배란율을 상승시키는 작용은 미약하거나 없는 것으로 나타났지만 (Table 2), 그러나 hCG는 배란율을 유의있게 증가시키는 것으로 나타났다 (Table 3).

Table 2. The effect of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) on the ovulation

GnRH(µg)	No. of goats	No. of ovulation points	No. of Graafian follicles
0	15	10.25 ± 1.28	4.00 ± 2.17
100	14	11.50 ± 2.75	1.75 ± 1.52
200	14	10.25 ± 1.44	1.00 ± 0.87

Table 3. Effects of two different gonadotropin treatment on superovulation

Treatment collected	No. of goats	No.(%) of goats ovulated	No. of ovulation points (mean)	No. ovum collected (mean)
FSH	44	16(36.4)	127(7.9)	70(4.4)
FSH+hCG	18	18(100.0)	174(9.7)	148(8.2)

(윤 등 1997)

한국 흑염소에서 MAP과 FSH를 이용하여 과배란 처리한 후 난소를 검사한 결과, 평균 배란점은 11.9개로 나타났다 (Table 4). 이러한 결과는 Kiessling et al (1986)이 dairy goat에서 MAP과 FSH를 사용하여 평균 15개의 배란을 유도한 결과보다는 적은 수이지만, 나 등 (1987)이 한국 흑염소에서 1000 IU의 PMSG와 3 mg의 PGF2 α 를 투여하여 평균 3개의 배란을 유도한 결과보다는 훨씬 효과적이었다.

Table 4. The number of ovulation points, embryos collected and collection rates following injection of total 20 mg FSH by decreasing method after MAP insertion

No. of goats	No. of ovulation points (M \pm E)	No. ova collected (M \pm E)	Recovery rate(%)
30	357 (11.90 \pm 0.75)	236 (7.87 \pm 0.67)	66.1

Table 5는 과배란 처리한 흑염소에서 MAP 제거 후 채란시간에 따른 수정란의 발달 단계를 확인한 결과이다. 즉 progesterone 삽입기구를 제거한 후 64시간 이내에 채취한 것에서는 미수정란의 비율이 너무 높고, 78시간 이후에 채취한 것은 대부분의 수정란이 2세포기 이상으로 발육되므로, pronuclear microinjection에 가장 적합한 수정란의 채취 시기는 progesterone 제거 후 66-76시간대로 밝혀졌으며, 이러한 결과는 다른 종류의 염소로 실험한 외국의 결과와도 유사하였다 (Selgrath et al 1990, Krisher et al 1994).

Table 5. Stages of embryos collected following MAP removal in superovulated goats

Hours post MAP removal	No. of donors	No. of ovulation points	Unfertilized oocytes	Embryo stages					Total embryos collected
				1-cell	2-cell	4-cell	16-cell	Deg.	
60 - 64	5	59(11.80 \pm 4.26)	33	5	0	0	0	1	5
66 - 70	8	84(10.50 \pm 3.71)	17	26	5	10	0	2	43
72 - 76	15	157(10.47 \pm 4.51)	11	78	18	1	0	3	109
90	1	9(9.00 \pm 0.00)	0	1	1	7	0	0	9
144-146	3	52(17.34 \pm 3.30)	0	0	0	0	27	1	28
Total	32	361(11.28 \pm 4.58)	61	109	23	18	27	7	186

3. 수정란의 채취 및 검사

과배란 처리된 공란염소를 교미 후부터 24시간 이상 절식시켜 2 %의 xylazine (Rompun[®], Bayer)을 체중 10 kg 당 0.05~0.15 ml (1.0~3.0 mg) 수준으로 근육 또는 정맥 주사하여 진정시킨 다음 양와 자세로 보정한다. 유방의 끝 부분과 배꼽을 잇는 정중선 피하에 2 % lidocane 8~10 ml를 주입하여 국소 마취시키고 정중선을 약 4-6 cm 정도의 절개한다. 절개 부위로 생식기를 완전히 노출시키고 자궁과 난관, 난소를 확인한 후 난소에서 배란점과 성숙 난포의 수를 검사한다. 난관의 관류를 위해 난관채 부분을 펴서 난관 복강구를 찾아 직경 2 mm 정도의 관류관을 장착하고 손으로 고정한다. 자궁각의 선단부내에 18~20 G의 혈관내 삽입용 plastic 주사침 (Introcan[®] or Jelco needle[®])을 끼우고 약 10 ml의 관류액이 든 주사기를 연결하여 자궁 각의 선단부에서 난관을 향하여 상향식으로 관류한다. 관류액으로는 1~2 %의 BSA 또는 FBS가 함유된 d-PBS 또는 TL-Hepes 3 (modified tyrode-lactate hepes medium) 등을 사용한다. 관류액을 멸균된 petri dish에 받아 실체현미경 아래서 검사하여 수정란을 회수한다. 채란 및 이식 과정에서 수정란과 접촉되는 모든 기구나, 재료는 warm plate위에서 38 °C로 예열시켜 사용한다.

수정여부를 확인하기 위하여 수정란을 가볍게 원심분리하여 male과 female의 pronucleus가 존재하는 지를 확인하고, 확인된 수정란의 male pronucleus에 외래 유전자를 microinjection한다. Microinjection이 끝난 수정란은 실험계획에 따라 곧바로 이식하거나, light mineral oil로 덮은 CR1aa medium 등의 배양액 microdrop 내에서 2 cell~hatched blastocyst로 발육될 때까지 수 시간~수 일간 배양하거나 (Lee et al 1997), morula~expanded blastocyst 단계에서 동결, 보존한다.

Table 6은 본 팀에서 pronuclear microinjection을 위한 흑염소 수정란의 최근의 채취 성적을 나타낸 표이다.

Table 6. Number of embryos collected for pronuclear microinjection in 1998-2000

Years	No. of donors		No. of ovulation points (mean)	No. of embryos recovered (mean)	Recovery rate
	Treated	Ovulated(%)			
1998-1999	257	224(87.1)	2,697 (12.0)	1,941 (8.67)	72.0
1999-2000	491	462(94.1)	6,291 (12.7)	4,332 (8.75)	68.8

4. 수정란의 이식

수란 흑염소의 수술 준비는 공란 흑염소에서와 동일하게 한다. 이식 전에 자궁, 난관 및 난소를 체외로 꺼내고 난소에 배란점 또는 황체의 존재 유무와 발육 단계를 세심히 관찰, 기록한다. 이식할 수정란의 발육 단계가 1~8 cell인 경우에는 난소에 CH1~CH3 단계의 corpus hemorrhagicum이 존재하는 수란 흑염소의 난관에, 그리고 morula 이상인 경우에는 자궁각의 선단부에 이식한다. 수정란은 1 ml용 주사기에 Micropipette을 장착하고, 미리 0.05 ml 정도의 배양액을 흡인한 다음 수정란이 들어 있는 부분 양쪽에 미세한 공기층을 만들어 이식할 수정란의 존재 및 이식 여부를 확인할 수 있도록 한다. 통상 한 마리당 2~3 개의 수정란을 배란된 난소와 동일한 쪽 자궁각에 이식한다.

Table 7은 최근 2년간 본 팀에서 pronuclear microinjection된 흑염소 수정란의 이식을 위한 수란흑염소의 발정 동기화 처리 결과 및 이들 수정란의 이식 성적을 간략히 나타낸 표이다.

Table 7. Estrus synchronization and results of transfer of pronuclear microinjected goat embryos in 1998-2000

Years	No. of recipients			
	Treated	Synchronized (%)	Transferred	Pregnant (%)
1998-1999	139	66 (47.5)	66	20 (30.3)
1999-2000	433	280 (64.7)	230	108 (46.9)

Gootwine et al (1997)은 1995년 여름부터 1996년 봄까지 CIDR를 처리하여 recipient로 준비한 총 334마리의 Saanen 종과 Nubian x Damascus 종 염소 중, 86% (283마리)에서 발정동기화가 이루어졌고 human serum albumin gene construct를 pronuclear microinjection하여 2 세포기로 발육시킨 수정란을 2개씩 이들 염소에 이식한 결과, 평균 29.0% (82두)가 임신되었다고 하였으며, Ebert와 Schindler (1993)은 1989년부터 1992년까지 4년동안 총 190마리의 Alpine 또는 Saanen 종 염소의 난관 또는 자궁에 microinjection 직후 또는 72시간 체외배양하여 발육시킨 총 782개의 (평균 4.1개) 수정란을 이식한 결과, 평균 56.3%의 수태율을 얻었다고 하였다.

5. 임신진단

염소에서 임신진단은 다른 동물에서보다 어렵다. 보통 때도 배가 불러 있는 경우가 대부분이며, 크기가 작아 대동물에서 처럼 직장검사를 할 수가 없고 피부가 두꺼워 촉진하기도 나쁘다. Table 8은 염소에서 여러 가지 임신진단법에 대한 요약으로, 정확도는 실시하는 사람과 각각의 농장에서 자주 발생하는 질병(감염성 유산, 영양장애로 인한 조기 태아사, 자궁수종 등)에 따라 크게 달라질 수 있다.

Table 8. Pregnancy diagnosis techniques for goats

Technique	Stage of pregnancy	Accuracy %		Potential Errors	References
		Pregnant	Nonpregnant		
Estrus detection	18-24 d	vary		end of breeding season	
Serum progesteron	19-24 d	87	97	irregular cycle, false preg., early abortion	Thibier et al. (1982)
Milk progesteron	19-24 d	varies with each kit/antiserum		false preg.	Pennington et al. (1982) Dionysius et al. (1991)
Urinary or serum estrone sulfate	after 50-60 d	about 100	about 100		Williams et al. (1986) Sardjana et al. (1988)
Ballottement	after 100 d			goat fat or tense	
Radiography	after 70-90 d	about 100	about 100	uterine enlargement	Barker et al. (1967) Lindahl et al. (1969)
Doppler	>35 d (rectal) >45 d (abdom.)	95	25-75	false preg.	Fraser et al. (1971) Ott et al. (1981)
Real-time ultrasound	>25 d (rectal) >35 d (abdom.)	about 100	87	false preg. (fluid, no fetus or caruncles)	Buckrell et al. (1988) Baronet et al. (1989)

본 팀에서도 연구의 초기에는 임신 45일 이후에 복부 초음파를 이용하여 진단 하였으나, 현재는 간혹 3.5 MHz transducer로 임신 30일 전, 후에 복부에서 실시 하는 경우를 제외하고는, 대부분은 임신 25일 전, 후에 5~6 MHz의 직장 또는 질 probe를 이용하여 거의 100 % 진단해내고 있으며 2주 정도 후에 확인 검진을 실시하고 있다.

6. 결 론

소에 비해서는 비록 보잘 것 없는 진보이지만, 지난 30여 년 동안 염소 수정란 의 생산과 이식에서도 많은 발전이 이루어 졌다. 이러한 발전은 형질전환 동물 에 대한 세간의 관심과 이에 대한 연구에 괄목할 만한 성과가 얻어졌으며, 특히 염소가 형질전환 동물의 생산에 매우 적합한 동물이라는 것을 인식하였기 때문 이다.

한국 재래 흑염소는 여러 가지 장점 (다루기 쉽고, 적응력이 높고, 번식이 잘 되며, 임신 기간이 짧은 것 등등)을 가지고 있어 우리 나라에서 형질전환 동물을 만들기에 아주 적합한 동물이다. 저자들은 최근 수년간 재조합 유전인자의 pronuclear microinjection을 통한 형질전환 흑염소를 생산하기 위해 꾸준히 연구, 노력하고 있으며, 한국 재래 흑염소에서 과배란 처리, 발정동기화, 수정란의 채 취와 이식 방법을 정립하고자 그 동안 숭한 시행착오를 거친 끝에 지금까지 ‘메 디’를 포함한 2 마리의 hG-CSF를 젖으로 생산할 수 있는 흑염소를 생산하는데 성공하였다.

그러나 흑염소에서 수정란 채취 및 이식이 수술적인 방법에만 국한되어 있 기 때문에 수술 부위와 생식기의 유착 등이 필연적으로 수반되므로 이로 인해 고가의 공란 흑염소에서 수정란의 생산이 제한되고 수란 흑염소의 활용도가 떨어지는 등의 문제가 발생되고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위한 방 편으로 비 수술적 방법 및 복강경에 의한 수정란의 채취와 이식에 대한 연구를 수행 중에 있다.

7. 참고문헌

- Amstrong DT, Piftzner AP, Ralph MM, Warnes GM, Seamark RF. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J Reprod Fert* 67: 395-401, 1983.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke R, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17, 456-461, 1999.
- Baril G, Pougard JL, Freitas VJF, Leboeuf B, Saumande JA, New method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology* 45, 697-706, 1996.
- Bondioli KR, Wright RW Jr. Superovulation of goat with FSH or FSH + LH following synchronization of estrus. *Theriogenology* 15: 118, 1981.
- Bongso TA, Fatimah I, Dass S. Synchronization of estrus of goats treated with progestagen sponge impregnated intravaginal sponges and PMSG and reproductive performance following natural mating or insemination with frozen semen. *Anim Reprod Sci* 5: 111(Abst), 1982.
- Bretzlaff KN, Nuti LC, Scarfe AD, et al. Luteinizing hormone and progesterone concentrations and induction of estrus after use of norgestomet ear implants or constant infusion of gonadotropin-releasing hormone in anestrous, nonlactating dairy goats. *Anim J Vet Res* 52: 1423-1426, 1991.
- Bretzlaff KN, Madrid N. Clinical use of norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronization of estrus in anestrous dairy goats. *Theriogenology* 9-423, 1989.
- Ebert KM, Schindler JES. Transgenic farm animals: Progress report. *Theriogenology* 39, 121-135, 1993.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K, 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, 1991.
- Gootwine E, Barash I, Bor A, Dekel I, Friedler A, Heller M, Zaharoni U, Zenue A, Shani M, Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology* 48, 485-499, 1997.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Macmillan J Ltd* 315(6021):680-683, 1985.
- Haskell RE, Bowen RA. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol Reprod Develop* 40:386-390, 1995.

- Kissling A, Hughes WH, Blankevoort M. Superovulation and embryo transfer in the diary goat. *JAVMA* 188: 829-832, 1986.
- Krisher RL, Gwazdauskas FC, Page RL, Russell CG, Canseco RS, Sparks AET, Velander WH, Johnson JL, Pearson RE, Ovulation rate, zygote recovery and follicular populations in FSH-superovulated goats treated with PGF2 α and/or GnRH. *Theriogenology* 41, 491-498, 1994.
- Lavitrano M, Camaioni A, Frazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723, 1989.
- Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moiola B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc* 29(8):3508-3509, 1997.
- Lee WK, Han YM, Shin ST, Lee DH, Yoo OJ, Lee KK, In vitro development of DNA-injected embryos co-cultured with goat oviduct epithelial cells in Korean native goats (*Capra hircus aegagrus*). *Theriogenology* 47, 1115-1123, 1997.
- Maga EA, Murray JD. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology* 13:1452-1457, 1995.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS. Studies on the Technological Development of Embryo Transfer and Manipulation in Goats. :I. Estrus induction and synchronization in goats. *Korean J Anim Sci* 31(1)8-14, 1989.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS. Studies on the Technological Development of Embryo Transfer and Manipulation in Goats. :II. Short estrous cycle following parturition or abortion in goats. *Korean J Anim Sci* 33(4)281-287, 1991.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS. Studies on the Technological Development of Embryo Transfer and Manipulation in Goat. :III. Induction of superovulation with PMSG or FSH in goats. *Korean J Anim Sci* 33(4)288-293, 1991.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS and Park HS. Studies on the Technological Development of Embryo Transfer and Manipulation in Goat. :IV. Production of monozygotic twins by bisection of mouse and goat embryos. *Korean J Anim Sci* 33(4):294-301, 1991.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS and Park HS. Studies on the Technological Development of Embryo Transfer and Manipulation in Goats. :V. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of mouse and goat embryos. *Korean J Anim Sci* 33(5):342-347, 1991.
- Robin NJ, Laforest P, Lussier JG, et al. Induction of GnRH or PMSG in lactating goats primed with a progestagen during seasonal anestrus. *Theriogenology* 42: 107-116, 1991.

- Rubianes E, Kmaid S, Castro T de, Carbajal B, Benquet N and Pinczak A. Superovulatory response to FSH treatments initiated at wave 1 emergence or 4 days after CIDR insertion in ewes. *Theriogenology* 47:176(Abstr), 1997.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scorr AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-2133, 1997.
- Selgrath JP, Memon MA, Smith TE, et al. Collection and transfer of microinjectable embryo from dairy goats. *Theriogenology* 34: 1195-1205, 1990.
- Wang B, Page RL, Yang X. Improved transgenic efficiency in rabbits attributed to successful microinjection, embryo transfer and animal husbandry procedures. *Theriogenology* 45:342, 1996.
- Youn WS, Lee CS, Goldman I, Fang NZ, Koo DB, Han YM, Shin ST, Yoo OJ, Park CS, Lee KK, Studies on the superovulation and collection of microinjectable embryos in Korean native goats (*Capra hircus aegagrus*). *Korean J Anim Reprod* 21, 373-379(in Korean), 1990.
- 나진수, 김용식, 강병규. 재래산양의 수정란이식. *한축지* 29: 295-302, 1987.
- 송호준, 박충생. 재래산양의 발정유기 및 동기화에 관한 연구. *한축지* 26: 13-22, 1984.
- 송호준, 박충생. 재래산양의 번식의 계절성 및 분만과 유산후의 발정재귀. *한축지* 26(4): 350-356, 1984.
- 송호준, 박충생. 재래산양의 발정주기 및 발정지속시간에 관한 연구. *한축지* 26(6): 527-533, 1984.
- 송호준, 박충생. 재래산양의 발정주기중 혈청 progesterone 및 Estradiol-17 β 의 수집의 변화. *한축지* 27(10):628-633, 1985.