

토끼 수정란에서 Green Fluorescent Protein 유전자의 발현

강태영 · 윤화준 · 채영진* · 이항* · 이효종
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Expression of Green Fluorescent Protein(GFP) Gene in Rabbit Embryos

T. Y. Kang, X. J. Yin, Y. J. Chae*, H. Lee* and H. J. Lee

College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The efficiency of transgenic livestock animal production may be improved by early selection of transgenic preimplantation embryos. To examine the possibility of GFP gene as a non-invasive marker for the early screening of transgenic embryos, the GFP gene was microinjected into rabbit zygotes and the later stages of preimplantation embryos were examined for the expression of GFP. The presence of injected DNA was detected by PCR analysis and the expression of GFP was detected by observing green fluorescence in embryos under a fluorescent microscope. Out of 108 GFP gene-injected rabbit zygotes, seventy three(67.6%) developed to blastocysts. The rate was significantly($P < 0.01$) lower than the rate of non-injected zygotes. Of the 73 zygotes developed to blastocysts, 33(45.2%) were fluorescence-positive. When 11 fluorescence-positive blastocysts were analyzed for the presence of GFP gene by PCR, 6(54.5%) were positive, and all of the 8 fluorescence-negative blastocysts were also negative by PCR. The results indicate that the screening of transgene in rabbit embryos by PCR analysis and GFP detection could be a promising method for the preselection of transgenic embryos.

(Key words : GFP gene, PCR, transgene preselection, rabbit)

서 론

형질전환 동물생산기술(transgenic animal technology)은 가축에서 생산효율 및 축산식품의 품질 향상, 고가의 유용한 인체단백질이나 약물의 생산, 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, 질병과 생체기작 및 장기이식에 관한 연구, 질환모델동물의 생산 등에 있어서 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때

문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다. 형질전환 동물은 미국을 위시한 선진국에서 특허로 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위하여서는 국내에서의 기술개발이 필요하다.

이러한 형질전환동물을 생산하기 위하여 유익한 외래유전자를 수정란의 응성전핵내에 미세주입하는 기술이 개발 응용되었으나, 그 효율이 매우 낮은 문제점이 있다. 이러한 낮은 효율성을 극복하기 위

*본 연구는 한국과학재단에서 1996년도에 지원한 목적기초 연구사업비(KOSEF: 961-0606-052-2)와 농림부 첨단기술개발과제 연구비에 의하여 수행되었음.

*서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

하여는 많은 수의 수정란에 유전자를 미세주입하고 대리모에 이식한 다음 소수의 형질전환개체를 선별하여야 하나, 이러한 방법은 대동물에서는 비용면에서 커다란 부담이 되므로 형질전환기술 개발의 주요한 장애요인이 되고 있다. 이러한 장애를 극복하기 위하여 최근에 태아의 섬유아세포를 transfection시킨 다음 핵이식으로 형질전환동물을 생산하는 기법이 시도되고 있다(Cibelli 등, 1998). 다른 한편으로 수정란에 미세주입된 외래유전자가 핵유전체에 통합되었는지를 배반포기 전에 검색하여 형질전환된 embryo 만을 대리모에 이식함으로써 그 효율을 높이려는 노력도 진행되고 있다. 형질전환 수정란을 검색하기 위하여는 PCR을 이용하거나 혹은 firefly luciferase나 green fluorescent protein (GFP) 유전자 등을 reporter gene으로 사용하고 있다(Bowen 등, 1993; Cousens 등, 1994; Menck 등, 1998; Chan 등, 1999). GFP는 해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 유래한 단백질로 자외선 조사시 형광을 발하는 성질이 있어 살아있는 식물이나 동물에서 외래유전자의 역동학을 조사하는 데 광범위하게 사용되고 있으며 형질전환동물의 조기감별에도 응용할 수 있는 가능성을 열어 주었다(Chalfie 등, 1994; Ikawa 등, 1995; Huang 등, 1997; Takada 등, 1997; Chiocchetti 등, 1997; Chan 등, 1999). GFP 유전자를 형질전환동물 조기 선별에 이용하면 세포에 해를 줄 수 있는 기질을 사용할 필요가 없고 biopsy로 인한 수정란의 손상도 줄일 수 있으며, 짧은 시간에 간편하게 유전자발현을 확인한 후 대리모에 이식함으로써 형질전환동물 생산의 효율성을 크게 높일 수 있을 것으로 기대되고 있다. Ikawa 등(1995)은 이를 응용하여 형광을 띠는 GFP-양성의 수정란 82개를 선별하여 대리모에 이식하여 얻은 32마리의 산자 중 3마리의 GFP-transgenic mice를 생산하였고 Takada 등(1997)은 GFP-양성 수정란 55개를 이식하여 태어난 12마리의 산자 중 8마리의 형질전환 생쥐를 생산함으로써 통상적인 방법에 의한 형질전환생쥐의 생산율보다 커다란 효율향상을 이룰 수 있었다.

그러나 GFP 유전자를 이용한 형질전환동물생산은 생쥐에서만 보고되었고 아직 가축을 비롯한 다른 동물에서 보고된 예는 없다. 그러므로 이러한 기

법이 가축에서도 응용될 수 있는 지 확인하는 연구가 시급한 실정이다. 본 실험에서는 토끼를 모델동물로 사용하여 외래유전자로서 GFP 유전자를 음성전핵 내에 미세주입하고 배반포기까지 체외발달시켜 이들에서의 유전자의 통합과 발현을 PCR 분석 및 형광현미경검정으로 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 토끼는 연암축산전문대학으로부터 공급받은 생후 3~5 개월령 New Zealand White 종 암컷으로 체중은 3~3.5 kg인 것을 사용하였고, 수컷 토끼는 생후 10 개월 이상 된 것으로 체중은 4 kg 이상인 것을 공시하였다. 이들에게 사료(토끼용 펠렛사료, 퓨리나)와 물은 자유로이 급식시켰으며, 명암조절은 14시간은 조명하고 10시간은 차광하였다.

2. 과배란유기와 수정란의 채란

과배란의 유기는 성숙한 암컷토끼에 100 IU의 eCG(Serarumon, Denka Co. Japan)로 근육주사하고, 72시간 후 수컷토끼와 교미시킨 다음 100 IU의 hCG(hCG, Yuhan Co., Korea)를 이정맥으로 주사하였다. 수정란의 채란은 hCG 주사 후 18~22 시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl(Sepamin, Samsung Co., Korea)를 25 mg/kg으로 근육주사하여 진정시키고 하복부의 털을 제거하였다. 그리고 ketamine HCl(Ketara, Yuhan Co., Korea)을 25 mg/kg으로 이정맥주사하여 전신마취를 유도하고 베타딘과 알콜스폰지로 소독하고 하복부 정중선 절개로 개복수술을 실시하였다. Catheter를 이용하여 토끼의 난관누두부쪽으로 삽입하고 자궁난관 접합부에서 D-PBS가 든 주사기로 역관류하여 수정란을 채란하였다. 채란된 수정란은 실험현미경상에서 검경하여 세포질이 정상인 것과 전핵형성이 뚜렷하게 잘 보이는 것을 선택하여 실험에 공시하였다.

3. 유전자의 준비

본 실험의 미세주입에 사용한 유전자는 Takada 등(1997)이 형질전환생쥐를 생산하기 위하여 사용

하였던 CE321-FL GFP expression vector plasmid를 분양받아 준비하였다. 이 vector는 더 긴 파장에서 형광을 발하도록 개선된 돌연변이(S65T) GFP 유전자를 포함하며, 사람 EF-1 promoter와 CMV-IE enhancer의 조절부위를 가지고 있다. 플라스미드를 Hind III와 BamHI으로 절단하고 agarose gel에서 전기영동하여 2.7 kb의 절편을 확인한 후 이 band의 DNA를 glass bead adsorption 방법(Qualex II kit, Qiagen, Chatsworth, CA, USA)으로 분리하고 정제, 농축하였다. 정제된 DNA를 microinjection buffer(10 mM Tris, pH 7.4; 0.2 mM EDTA)에 용해시켜 표준농도의 DNA와 함께 agarose gel 상에서의 비교로 농도를 결정하고 2 ng/μl 농도로 희석하여 300 μl 씩 microcentrifuge tube에 분주하여 -20℃에 보관하였다가 injection에 사용하였다(Polites와 Pinkert, 1994).

4. 외래유전자의 수정란내 미세주입

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경 하에서 실시하였다. 수정란의 응성전핵에 준비된 GFP 유전자를 약 2~3 pl 정도 조심스럽게 주입하여 핵막이 약간 부풀어 오를 정도에서 미세파젯을 후진하였다. 수정란의 체외배양은 미세주입이 끝난 후 세포질이 파괴되지 않은 것만 골라 TCM-199과 RD 배양으로 옮겨 토끼의 난관상피세포와 같이 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

5. 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양을 위하여 먼저 토끼 난관상피

세포의 준비는 도살된 토끼의 난관을 penicillin G (500 unit/ml)와 streptomycin(500 μg/ml)이 첨가되어있는 생리식염수로 깨끗이 세척한 다음 멸균된 거즈로 난관 표면을 닦고 결합조직과 지방조직을 제거하였다. 70% 알콜에서 소독한 다음 다시 항생제가 첨가된 식염수로 세척하고 TCM-199 배양액(GibcoBRL, USA) 1 ml이 들어있는 주사기로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취된 난관상피세포는 500 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을 2회 이상 원심분리기로 세척하여 1~2×10⁶ cells/ml의 최종농도로 조절한 다음 10% fetal calf serum(FCS, Sigma, USA)을 첨가한 TCM-199 배양액으로 배양시켜 사용하였다.

수정란의 체외배양은 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액과 D-MEM(GibcoBRL, USA)와 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)을 1:1로 희석하여 만든 RD 배양액을 토끼의 난관 상피세포와 같이 39℃의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다. 그리고 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, RD 배양액은 48시간 배양한 후 TCM-199 배양액으로 교환하였다.

6. 토끼 수정란에서 외래유전자의 검색

1) GFP 유전자 검색을 위한 PCR

GFP 유전자 검색을 위한 PCR 조성액의 구성은 1×PCR buffer, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 M primer, 0.5 U Taq polymerase 로 하였다.

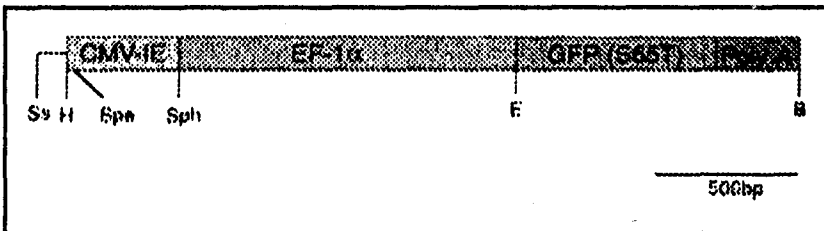


Fig. 1. Restriction map of green fluorescent protein (GFP) transgene. The GFP transgene contains the CMV-IE enhancer, the elongation factor 1 α (EF-1 α) promoter, GFP (S65T) gene, and SV40 early poly (A) signal. Ss, SspI: H, Hind III: Spe, SpeI: Sph, SphI: E, EcoRI: B, BamHI.

PCR 증폭을 위한 primer는 Oligo 4.0 Primer Analysis Software(National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA)를 사용하여 설계하였고 한국생공으로부터 주문제작하였다. 그 염기배열은 다음과 같으며 이 primer 쌍을 사용하여 증폭되는 DNA 생성물의 예상 길이는 414 bp이다.

P1 (forward), 22-mer,
5' -TTGCACTACTGGAAAACCTACCT- 3'
P2 (reverse), 22-mer,
5' -TTTTGTTGATAAATGGTCTGCTA- 3'

PCR cycle은 다음과 같은 조건으로 실시하였다.

1st cycle	denaturation	96°C	300 sec
	annealing	61°C	35 sec
	extension	72°C	32 sec
2-44 cycle	denaturation	96°C	35 sec
	anealing	60°C	35 sec
	(touch down 1°C /7cycle)		
	extension	72°C	32 sec
last extension		72°C	300 sec

PCR 반응의 negative control로는 GFP 유전자를 주입하지 않은 토끼수정란과 멸균된 증류수를 사용하였으며, positive control로는 약 100 fg의 CE321-FL GFP plasmid를 사용하였다.

2) PCR 생성물 분석

PCR 반응 생성물 중 약 15 µl를 SeaKem LE (FMC, Rockland, ME, USA) agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

3) 형광현미경에 의한 GFP 유전자 발현의 검색

토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 배반포기까지 자라는 동안 이들에서의 유전자발현을 excitation: 488 nm, emission: 500 nm의 GFP filter (Chroma Tech, Corp., USA)가 장치된 형광현미경(Diaphot 300®, Nikon Co., Japan)으로 관찰 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 Chi-Square test를 실시하여 시험군간의 유의차를 검정하였다.

결 과

1. GFP 유전자주입 토끼 수정란의 체외발달률

토끼 수정란의 응성전핵에 GFP 유전자 또는 buffer를 미세주입한 후 TCM-199 배양액으로 체외배양하여 이들의 발달능력을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. GFP 유전자를 미세주입한 토끼 수정란의 배반포까지의 발달률을 67.6%였으며, 이는 buffer를 미세주입한 것과 유전자를 주입하지 않은 정상 토끼 수정란에서의 배반포 발달률 72.4%와 83.2%에 비하여 유의적($P < 0.05$ 및 $P < 0.01$) 차이를 나타내었다.

2. GFP 유전자주입 토끼 수정란의 유전자 발현율

토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하여 배반포기까지 발달시킨 다음, 이들에서 GFP 유전자의 발현 여부를 형광현미경으로 관찰하였던 바, 45.2%가 양성을 보였다(Table 2 및 Fig. 2). 또한 형광현미경 상에서 GFP 양성을 보인 11개의 수정란을 PCR 검색하였던 바, 6개(54.5%)는 역시 PCR 검색에서도 양성을 보였고, 5개(45.5%)는 음성을 보였다. 형광현미경상에서 GFP 음성인 수

Table 1. Effect of GFP gene injection on *in vitro* development of rabbit zygotes

Injection groups	No. of zygotes injected	No. of zygotes developed to (%)	
		Morula	Blastocyst*
Control (non-injected)	197	171	164(83.2) ^{aA}
Control (buffer-injected)	185	153	134(72.4) ^b
GFP gene-injected	108	94	73(67.6) ^B

* The values with different superscripts of small ($P < 0.05$) and capital ($P < 0.01$) letters within column were significantly different.

Table 2. GFP expression in rabbit blastocysts following injection of GFP gene and *in vitro* culture

No. of blastocysts observed	GFP expression	
	No. of positive(%)	No. of negative(%)
73	33 (45.2)	40 (54.8)

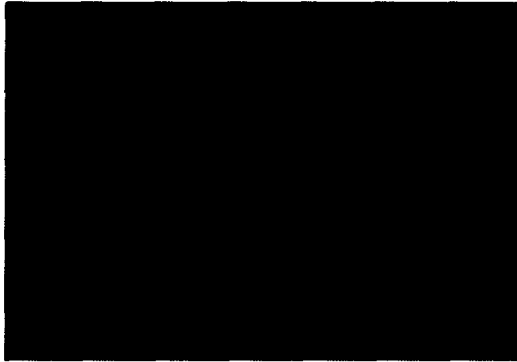


Fig. 2. GFP expression in rabbit embryos at morular stage under a fluorescent microscope (200 ×).

정란은 PCR 검색에서도 모두 음성을 보였다(Fig. 3).

고 찰

형질전환생쥐의 유전자검색은 대개 3~4주 된 산자의 조직으로부터 DNA를 추출한 후 PCR이나 Southern blotting 방법을 이용하였다(Gendron과 Gridley, 1993; Hogan 등, 1994). 그러나 이러한 검출방법을 모든 산자에 적용하자면 많은 경비와 시간이 소모된다. 형질전환생쥐 산자를 신속히 분리하기 위하여 marker transgene과 co-injection 하는

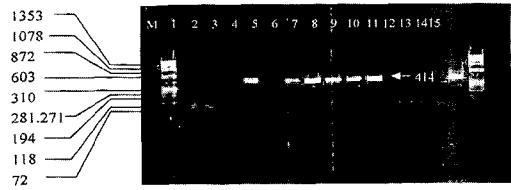


Fig. 3. Detection of GFP transgene in rabbit embryos by PCR (414 bp). M, marker DNA (ϕ X174/ HaeIII, bp): Lane 1-11, blastocysts injected with GFP gene; Lane 12-13, negative control; Lane 14, positive control.

방법이 시도되었다(Overbeek 등, 1991; Bonnerot와 Nicolas, 1993). 예를 들면, tyrosinase가 결핍된 생쥐는 색소결핍증으로 흰색으로 된다. 그러므로 흰색 생쥐 난자에 tyrosinase minigene을 주입하면 형질전환생쥐의 모색은 검거나 유색으로 나타날 것이다(Overbeek 등, 1991). Ikawa 등(1995)은 GFP가 발현되는 형질전환 산자를 분만 1일에 390 nm의 excitation light로 녹색의 발광색을 비침습적인 방법으로 관찰하였다. 형질전환산자를 간단하게 검색하는 방법은 형질전환생쥐의 계통을 확립하는데 유용할 것이다. 더욱이 소, 돼지와 같은 중대형동물에서의 긴 임신기간과 한정된 산자수, 유지비용 등을 고려할 때, 이들 동물에서 형질전환개체를 효율적으로 생산하기 위하여는 초기 수정란 단계에서 외래 유전자를 검색하는 것이 바람직하다. 배반포의 biopsy와 PCR로 유전자는 물론 X-, Y-염색체를 확인할 수 있으므로 수정란의 유전자를 효과적으로 검색할 수가 있다(Cui 등, 1993; Kirkpatrick과 Monson, 1993; Lui 등, 1994). 그러나 가능하다면 biopsy가 필요없고 간편한 비침습적 검색법이 형질전환개체를 선별하는데 더욱 유리할 것이다. 이런 목적을 위하여 예전부터 β -galactosides, chloram-

Table 3. Screening of GFP transgene in rabbit blastocysts by PCR and fluorescence microscopy

GFP expression	No. of gene-injected blastocysts	PCR-screening of GFP gene	
		No. of positive(%)	No. of negative(%)
+	11	6 (54.5)	5 (45.5)
-	8	0 (0)	8 (100)

phenicol acetyl transferase(CAT)나 luciferase와 같은 reporter gene을 사용하여 왔는데 이들은 수정란에 해로운 영향을 줄 가능성이 있다. 최근 firefly luciferase를 이용하여 비침습적인 방법으로 형질전환 수정란을 분리하였다는 연구결과가 보고되었으나 아직 이 방법으로 산자를 생산하는 데에는 성공하지 못하였다(Thompson 등, 1995; Menck 등, 1998).

해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 분리된 GFP는 푸른 빛을 흡수하여 유기기질이나 cofactor의 도움없이 초록형광을 방출한다. 그러므로 GFP의 검사는 luciferase, β -galactosidase나 CAT 등의 효소반응을 이용할 때와 같은 추출이나 기질을 필요로 하지 않으며 PCR 방법과 같이 많은 시간과 여러 단계를 거치지 않고 살아있는 수정란에서 쉽고 빠르게 유전자의 발현 여부를 알 수 있다. 그러므로 GFP 유전자를 수정란에 주입하고 체외발달시켜 형광현미경으로 관찰하여 초록색 빛을 발산하는 수정란을 선택하여 이식함으로써 형질전환동물 생산의 효율향상에 획기적인 계기가 될 수 있다. Ika-wa 등(1995)은 GFP 유전자가 유전자전환 동물의 marker로서 적합하다고 보고하였다. 그들은 생쥐를 대상으로 GFP 유전자를 166개의 수정란 전핵 내에 주입하고 이를 이식하여 16(9.6%) 마리의 산자를 생산하였는데, 그 중 3마리(1.8%)의 조직에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다. Takada 등(1997)은 생쥐 및 소 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 생쥐에서 46.9%, 소에서 11% 이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 각각 39.9%와 9.3%가 양성을 보였다. 본 실험에서는 토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 67.6%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 45.2%가 양성을 보였다. 실험 수정란 수가 적고 토끼에 관한 다른 연구 보고가 없으므로 정확한 비교가 어려우나 Takada 등(1997)의 연구결과와 비교할 때 생쥐의 발달율에 비하여 토끼의 발달율이 상당히 높은 것으로 나타났으며, GFP의 발현율도 약간 높았다. 이들 수정란을 PCR 검색하였던 바, GFP 형광양성을 보인 11개의 수정란에서 6개(54.

5%)는 역시 PCR 검색에서도 양성을 보였고, 5개(45.5%)는 음성을 보였다. GFP 형광 검색에서 양성을 보인 수정란 중 45.5%가 PCR 검색에서는 GFP 유전자가 검출되지 않은 이유에 대해 정확한 설명은 어렵지만 GFP 형광의 양성, 음성 판정이 명확치 않았거나 혹은 PCR 검색시 일부 시료가 가음성으로 나왔을 가능성도 있다. 그러나 GFP 형광검색에서 음성으로 나온 수정란은 모두 PCR 검색에서도 음성으로 나온 결과로 보아 GFP 형광을 이용한 검색으로 상당수의 non-transgenic을 제거할 수 있음을 보여 준다. Takada 등(1997)은 GFP 양성인 생쥐 수정란을 대리모에 이식하여 22%의 산자 생산율을 얻었고 이중 11마리(8%)에서 GFP 유전자의 발현을 확인하였다.

이와 같은 결과로 보아 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하여 수정란을 이식 전에 검색함으로써 형질전환동물생산의 효율이 높아질 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로 앞으로 GFP 유전자와 유용유전자를 융합하거나 coinjection함으로써 GFP 유전자의 발현과 유용유전자의 발현을 연계시키는 방법에 대한 깊이있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

토끼 수정란의 응성전핵 내에 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재 여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하였다. 토끼수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외 배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 67.6%였다. 이들 배반포 중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 45.2%였다. 이들 GFP 양성반응 11개의 배반포를 PCR screening한 결과, 54.5%가 양성으로 검출되었다. 그러나 형광현미경 상에서 음성으로 나타난 8개의 배반포는 PCR screening에서도 모두 음성으로 나타났다. 이러한 결과로 보아, GFP 유전자를 marker gene으로 활용하여 수정란을 이식 전에 검색함으로써 형질전환동물생산

의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구에 사용된 GFP expression vector를 공급하여 주신 일본 National Children's Medical Research Center의 Dr. Tatsuyuki Takada께 감사드립니다.

참고문헌

- Bonnerot C and Nicolas JF. 1993. In : Methods in Enzymology(Wassarman, PM and DePamphilis. ML eds). Vol. 225. pp. 451-469. Academic Press London.
- Bowen RA, Reed M, Schnieke A, Seidel Jr, GE, Brink Z and Stacey A. 1993. Production of transgenic cattle from PCR-screened embryos. *Theriogenology*, 39:194
- Brem G. 1993. Inheritance and tissue-specific expression of transgenes in rabbits and pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:242-244.
- Carver AS, Dalrymple MA, Wright G, Cottom DS, Reeves DB, Gibson YH, Keenan JL, Barrass JD, Scott, AR and Colman A. 1993. Transgenic livestock as bioreactors : stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Bio /Technology*, 11:1263-1270.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805.
- Chan AW, Kukolj G, Skalka AM, Bremel RD. 1999. Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Dev.*, 52:406-413.
- Chiocchetti A, Tolosano E, Hirsch E, Silengo L and Altruda F. 1997. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression in transgenic mice. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1352: 193-202.
- Chung CT and Miller RH. Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. In *Methods in Enzymology*. Vol. 218. Academic Press, 1993 pp. 621-627.
- 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.
- Clements JE, Wall RJ, Narayan O, Hauer D, Schoborg R, Sheffer D, Powell A, Carruth LM, Zink MC and Rexroad CE. 1994. Development of transgenic sheep that express the visna envelope gene. *Virology*, 200:370-380.
- Cousens C, Carver AS, Wilmut I, Colman A, Garner I and O'Neill GT. 1994. Use of PCR-based methods for selection of integrated transgenes in preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:384-391.
- Cui KH, Putland RA, Seamark RF and Matthews CD. 1993. Precise sex selected births of mice following single cell embryo biopsy and Y-linked testis-specific gene analysis. *Human Reprod.*, 8:621-626.
- Gendron MM and Grindley T. 1993. In : Methods in Enzymology(Wassarman. PM and DePamphilis. ML. eds). Vol. 225. pp. 794-799. Academic Press. London.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F and Lacy E. 1994. In : Manipulating the Mouse Embryo(Hogan B, Beddington R, Costantini F and Lacy E. eds) 2nd end. pp. 291-326. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Huang Y, Xu XP and Li BJ. 1997. Improved green fluorescent protein as a fast reporter of gene expression in plant cells. *Bio /Technology*, 11:133-136.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka

- K, Nishimune Y and Okabe M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein(GFP). *FEBS Letter*, 375:125-128.
- Kirkpatrick BW and Monson RL. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J. Reprod. Fertil.*, 98:335-340.
- Lui J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A and Liebaers I. 1994. Amplification of X- and Y-chromosome-specific regions from single human blastomeres by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. *Human Reprod.*, 9:716-720.
- Menck M, Mercier Y, Campion E, Lobo RB, Heyman, Y, Renard JP and Thompson EM. 1998. Prediction of transgene integration by noninvasive bioluminescent screening of microinjected bovine embryos. *Transgenic Res.*, 7:331-341.
- Overbeek PA, Aguilar-Cordova E, Hanten G, Schaffner DL, Patel P, Lebovitz RM and Lieberman MW. 1991. Coinjection strategy for visual identification of transgenic mice. *Transgenic Res.*, 1(1):31-37.
- Pinkert CA and Stice SL. 1995. Embryonic stem cell strategies : beyond the mouse model. In: Monastorsky, GM., Robl, JM.(eds). *Strategies in transgenic animal science*. ASM Press, Washington, D. C. pp 73-88.
- Polites HG and Pinkert CA. DNA microinjection and transgenic animal production. In *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*. ed. Pinkert CA. 1994 Academic Press, SanDiego pp. 15-68.
- Pursel VG, Wall RJ, Solomon MB, Bolt DJ, Murray JD and Ward KA. 1997. Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine. *J. Animal Sci.*, 75:2208-2214.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Colding Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S and Logan JS. 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology*, 10:557-559.
- Takada T, Lida K, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S and Tsujimoto G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnology*, 15:458-461.
- Thompson EM, Adenot P, Tsuji FI and Renard JP. 1995. Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:1317-1321.
- Wagner SD, Williams GT, Larson T, Neuberger MS, Kitamura D, Rajewsky K, Xian J. and Bruggemann M. 1994. Antibodies generated from human immunoglobulin miniloci in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.*, 22:1389-1393.
- Wall RJ, Hawk HW and Nel N. 1992. Making transgenic livestock : Genetic engineering on a large scale. *J. Cell. Biochem.*, 49:113-120.
- Wilmot I and Whitelaw CB. 1994. Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:625-630.

(접수일 : 1999. 1. 17 / 채택일자 : 1999. 3. 7)