

한우 섬유아세포의 성 판별 및 세포주기 유도 분석*

김현주 · 강희성 · 최화식¹ · 이성호² · 박창식 · 진동일†
선문대학교 응용생물과학부

Sexing and Cell Cycle Induction of Hanwoo Fetal Fibroblast Cells

Kim, H. J., H. S. Kang, W. S. Choi¹, S. H. Lee², C. S. Park³ and D. I. Jin†

Department of Applied Biological Science, Sun Moon University

ABSTRACT

For somatic cell nuclear transfer in Hanwoo, fetal fibroblast cell lines were established from 35, 50, 70 and 90-day fetuses of Korean native cattle. The sex of these fetal fibroblast cells were analyzed by PCR using Y-specific primers and confirmed that two cell lines were female and the other two cell lines were male. Karyotyping of these cell lines indicates that the chromosome numbers of fetal fibroblast cells were not affected by passage number and more than 80% of fetal fibroblast cells have normal chromosome number.

To evaluate G₀ stage in cell cycle of fetal fibroblast cells, Western blotting was performed to detect the expression level of PCNA which is known to be expressed in all cell cycle stages except G₀ stage. Following serum starvation or confluent culture for 7 days, fetal fibroblast cells were effectively reached to G₀ stage. The cell cycle was resumed after culture of these G₀ stage-fetal fibroblast cells with normal medium.

These results indicates that fetal fibroblast cells originated from Hanwoo were successfully isolated and culture system and induction of cell cycle of these cells were established for somatic cell nuclear transfer in Hanwoo.

(Key words: Hanwoo fetal fibroblast cells, PCR sexing, Karyotyping, PCNA expression)

I. 서 론

체세포를 이용한 동물 복제의 성공으로 포유류에서 분화된 세포 유전물질의 전능성(totipotency)

이 비가역적이라는 과거의 개념으로부터 전능성의 획득이 가역적이라는 신개념으로 전환시키는 계기가 되었다(Campell 등, 1996; Wilmut 등, 1997; Kato 등, 1998; Vignon 등, 1998; Wells 등, 2003).

* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-03001-0) 지원으로 수행되었음.

† Corresponding author : Department of Applied Biological Science, Sun Moon University, Asan City, Chungnam, 336-708, Korea. E-mail : dij1@sunmoon.ac.kr

¹ 김천대학교 임상병리학과(Dept. of Clinical Pathology, Kim Chun College).

² College of Visual Image & Health, Kongju National University, Konju 314-712, Korea.

³ Division of Animal Science and Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

분화된 체세포인 유선상피세포(mammary epithelium cell)와 난구세포(cumulus cell) 및 섬유아세포(fetus fibroblast cell)를 이용하여 핵을 제거한 수핵란에 핵이식한 후 수정란이식을 통해 동물복제에 성공하였다. 이들 복제가 가능한 체세포 중 특히 섬유아세포가 유용할 것으로 예상되는데 그 이유는 섬유아세포는 태아로부터 분리하는데 큰 어려움이 없고 배양 및 보존이 용이하며 특히 다른 세포들에 비해 섬유아세포는 DNA transfection을 이용한 DNA 이식율이 높아 복제형질전환동물을 생산하는 데 유리하기 때문이다(Schnieke 등, 1997; Cibelli 등, 1998). 소에서 복제에 이용된 섬유아세포는 임신 50~60일령 태아로부터 trypsinization에 의해 분리되어 10% fetal calf serum의 DMEM에서 배양되었고 계대배양한 후에도 karyotype이 유지되는 것으로 확인되었다. 체세포 복제술에서 중요한 단계로는 체세포의 세포주기(cell cycle)를 Go 및 G₁ 상태로 유도하여 핵이식을 수행하는 것이다(Campbell와 Wilmut, 1998 ; Stice 등, 1998; Cho 등, 2002). 그이외의 세포주기에서는 수핵란에 핵이식한 후 DNA 복제가 제대로 일어나지 않아 비정상적인 염색체를 유발하여 정상적인 세포분열이 일어나지 않을 가능성이 높다고 보고되고 있다(Campbell와 Wilmut, 1996; Katska 등, 2002; Wells 등, 2003). 섬유아세포는 serum starvation 즉 배양액 중 serum의 양을 0.5%로 하여 4~5일간 배양하거나 confluent한 상태로 수일간 유지시키는 것에 의해 세포주기를 Go로 유도할 수 있는데 Go 세포주기에서는 세포가 정적인 상태로 유지되어 세포분열이 멈추고 세포내 생화학적 활동이 최소화되는 것으로 serum의 양을 다시 정상상태인 5~10%로 회복시켜 주거나 계대배양에 의해 세포분열이 다시 활성화된다. 세포의 Go 상태를 점검할 수 있는 생화학적 물질은 아직 알려져 있지 않으나 활발하게 세포분열이 일어나고 있는 세포에서는 proliferating-cell nuclear antigen(PCNA)이란 물질이 세포분열주기인 G₁, S, G₂, M에서 계속하여 활성을 나타내나 Go에서는 활성이 없는 것을 이용하여 antiPCNA antibody로 immunocytochemical staining에 의해 Go 상태를 검사할 수 있

고 serum starvation 후 세포분열이 멈추었다가 serum 첨가 후 세포분열이 재개되는 것으로 확인할 수 있다(Kill 등, 1991). 이렇게 Go로 유도된 섬유아세포를 이용하여 핵이식하였을 때 약 20~30%까지 이식 가능한 상실배나 배반포까지 발육을 나타내고 있어 공핵세포의 세포주기 유도가 중요한 것임을 알 수 있다(Campell 등, 1996; Wilmut 등, 1997; Schieke 등, 1997; Walls 등, 2003). 또한 복제동물의 생산이 보고되고 있지만 복제동물새끼에서 비정상적인 체중이나 호흡기계통과 대사에 이상이 있는 새끼가 태어나 분만 후 사망률이 높게 보고되고 있고, 핵이식 후 임신 중에 높은 사산율이 보고되고 있다(Garry 등, 1998; Han 등, 2003). 이러한 보고가 공여핵으로 사용되고 있는 체세포의 상태나 세포주기와 관련이 있는지에 대해서는 알려져 있지 않으나 체세포 복제술의 실용화를 위해서는 체세포의 상태나, 핵이식 기술 등 각 단계별로 효율을 증진시킬 수 있는 기술의 확립이 필요하다

본 연구에서는 한우에서 섬유아세포 복제기법의 효율을 증진시키고, 외래유전자가 함유된 한우 섬유아세포의 핵이식을 통한 형질전환 한우 생산의 효율을 높이기 위한 기초기술을 얻고자 태아세포를 확립하여 성관별 및 세포주기를 유도하고 PCNA를 이용한 세포주기상태를 분석하여 한우 섬유아세포의 정성적인 상태 및 세포주기 효율성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 한우 섬유아세포의 분리 및 배양

본 연구에서는 핵이식을 위해 한우 섬유아세포(fetal fibroblast cell) line을 이용하였는데 핵이식을 위한 다양한 cell line을 구축하기 위해서 한우에서 임신 35, 50, 70, 90일령의 한우 태아에서 fetal fibroblast cell을 분리하였다. 각 임신일령의 자궁을 회수하여 70% ethanol로 소독하고 penicillin과 streptomycin이 들어 있는 PBS로 씻어 준 다음 태막과 양막을 가능한한 무균상태로 열어 태아를 자궁으로부터 분리한 다음 태아를 PBS로 2~3번 씻

어주어 혈액과 체액을 제거하였다. 태아조직을 petridish위로 옮기고 trypsin 용액을 넣어 무균 미세수술용 가위나 나이프로 가능한 한 작은 조직으로 잘게 부수고 trypsin용액을 Erlenmyer flask로 옮기고 약 40~50 ml이 되도록 trypsin용액을 첨가하고 37°C shaking incubator에서 약 25~30분간 배양하였고 50 ml centrifuge tube에 옮겨 같은 양의 4°C DMEM(10% FCS)용액을 첨가하여 약 300g로 15분간 원심분리를 실시하였다. 조직 및 세포는 100mm petridish에 10% FCS를 첨가한 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 첫번째 섬유아세포는 passage no.0으로 간주하였다.

섬유아세포 동결보존을 위한 동결보존액의 조성은 50% FCS, 39% DMEM, 11% DMSO으로 사용하였으며 이 동결보존액으로 세포를 섞어 주고 Cryovial로 옮긴 후 -70°C freezer에 24시간 보존한 다음 액체질소에 넣어 보관하였다.

2. PCR을 이용한 Sexing

섬유아세포는 Y-specific primers를 이용하여 PCR로 sex를 확인하였다. 세포를 trypsinization한 후 회수하여 Proteinase K로 55°C에서 배양하고 phenol extraction하여 DNA를 정제하였고 sexing을 위한 primer로는 BOV97M(Miller와 Koopman, 1990)과 BRY4a(Reed 등, 1989)를 이용하였다. PCR 후 2% agarose gel을 이용하여 압수 성을 확인하였다. PCR을 위한 primer set는 다음과 같다.

(BOV97M)

5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3'

5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3'

(BRY4a)

5'-CAA GAC CAT ACA TAT GTC ATT ATA GAC AG-3'

5'-CAC AAA AAC AAA ATT TAT GTA CTT CAT GT-3'

PCR mixture는 DNA 100 ng, 10x buffer 5 ul, 1.25 mM dNTP, 100 pM primer와 2.5 unit Taq polymerase를 첨가하여 final volume이 50 ul가 되게 멸균 증류수로 섞어주고 mineral oil로 덮고 denaturation은 94°C 1분간, annealing은 55°C 30초

간, extension은 72°C 1분간을 35 cycle을 실시하여 PCR을 완료하였다.

3. Karyotyping

본 실험에서는 섬유아세포를 vinblastin sulfate으로 처리하여 metaphase에 정지시킨 다음 hypotonic 용액으로 팽창시킨 후 고정액을 첨가하여 slide위에 떨어뜨려 cell을 부수고 염색체가 퍼져 나오도록 하는 방법을 이용하였다. 먼저 10 ml 배양액 중에 자라는 섬유아세포에 50 ul의 vinblastin sulfate(2 ug/ml)용액을 첨가하고 37°C에서 2시간 정도 배양한 후 배양액을 따라내고 PBS로 2번 씻어내고 2 ml trypsin 용액을 넣고 2~3분 37°C에 배양하였다. 약 8 ml 배양액을 첨가하여 세포를 회수하고 원심분리하고 상층액을 따라내고 나머지 용액으로 세포를 섞어주고 15 ml의 hypotonic solution(3 g sodium citrate, 2.24 g potassium chloride/L)을 첨가하고 37°C water bath에 약 20분간 배양하였다. 그 후 5분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 나머지 용액으로 세포를 섞어주고 약 10 방울 정도의 Carnoy's fixative(100 ml glacial acetic acid, 200 ml methanol)를 떨어뜨리면서 세포에 섞어주었고 fixative를 4.5 ml까지 첨가한 후 흰 침전물을 가능한 제거하고 천천히 섞은 후 원심분리하였다. 상층액을 버리고 4 ml fixative를 첨가하여 원심분리시키는 작업을 2번 실시하였다. 마지막 상층액을 버리고 알맞은 농도의 세포가 되게 fixative를 넣어 (약 3~5 ml) 섞어주고 slides는 70% ethanol과 물과 잘 씻어 준비하고 세포를 slides 위에서 약 50 cm 높이 이상에서 떨어뜨린 후 slide를 저온의 hot plate에서 약 30분 말리고 Giemsa/Wright staining solution(0.1 g Giemsa crystal, 0.8 g Wright crystal/400 ml methanol)에 약 3분간 염색하고 PBS에 담가 slides를 씻어준 후 현미경하에서 염색체를 관찰하였다.

4. 세포주기 유도 및 분석

섬유아세포의 cell cycle의 Go stage의 유기는 serum starvation인 경우 serum의 양을 점차 낮추고 0.5% serum에서 4~5일 동안 배양하여 유도하였

고 또한 다른 방법으로는 serum의 농도를 줄이지 않고 confluent한 상태에서 7일 이상 배양에 의해 Go stage에 도달하게 하였다. Western blotting을 위해서 세포를 trypsinization 시킨 후 lysis buffer로 protein을 추출하였고 acrylamide gel에서 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% nonfat milk를 함유하고 있는 blocking buffer로 incubation한 후 1:1000으로 희석한 anti PCNA antibody(Novocastra Laboratories Ltd, UK)로 incubation하고 washing한 후 secondary IgG로 배양하고 washing한 다음 ECL detection kit를 이용하여 film에 expose시킨 다음 현상하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한우 섬유아세포의 확립 및 특성 규명

임신 35 일령, 50 일령, 70 일령 및 90일령의 태아를 각각 회수하여 각 태아의 붉은 조직과 뇌조직을 제거하고 잘게 절단한 후 Trypsin 처리하여 DMEM(5% FBS)로 배양하여 fetal fibroblast cell line을 확보하였다(Table 1). 태아 한 마리당 하나의 culture dish(10 cm)로 배양하였을 때 24시간 내 confluent한 상태가 되게 배분하여 배양하였다. 계

Table 1. Status of fetus fibroblast cell line of Korean native cattle

No	Age of fetus (day)	Sex*	Passage no.
KBFF101	35	F	30
KBFF201	50	F	25
KBFF301	70	M	20
KBFF401	90	M	20

* F: female, M: male.

대배양 실험에서는 confluent한 것을 1 : 5 로 희석하여 passing하였을 때 약 48시간 내에 confluent한 상태가 되었고 이러한 분열속도는 10 번 이상 passing을 하였을 경우에도 변화하지 않았다. 4개의 분리된 한우 fetus fibroblast cell line은 trypsinization을 시킨 후 1:5 또는 1:10 비율로 passing 시킨 것을 1 passage number로 하여 passage number를 test하였고 passage number가 증가함에 따라 doubling 되는 시간과 differentiation되는 상태를 조사하였다. 또한 액체질소에 freezing한 것을 passage 1로 하여 freezing 후 fetus fibroblast cell의 상태를 검사하였다. passage number가 약 20까지 증가하여도 cell 모양과 doubling time이 거의 변하

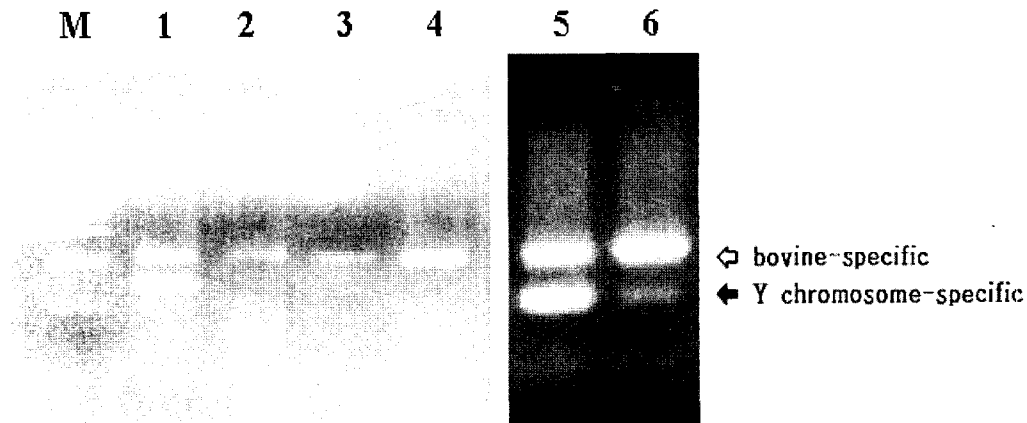


Fig. 1. Sex analysis of fetus fibroblast cells by PCR. M: DNA size marker, 1: male control, 2: female control, 3: KBFF101, 4: KBFF201, 5: KBFF301, 6: KBFF401, ⇨: bovine-specific band, ⇐: Y chromosome-specific band.

지 않았으나 passage number가 25 이후에서 약간의 세포분열 crisis의 경향을 나타냈다. 이러한 한우 섬유아세포의 세포배양 중 특징은 이미 보고된 다른 소품종의 섬유아세포의 특성과도 일치하는 것으로 DNA transfection 후 drug selection 및 DNA screening을 위한 충분한 계대배양이 가능한 것으로 나타났다(Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997; Schieke 등, 1997; Cibelli 등, 1998; Keto 등, 1998).

또한 Bovine specific primer set와 Y-specific primer set를 이용하여 PCR을 실시한 후 각 섬유아세포의 sex를 확인하였다(Fig. 1). 확립된 네 개의 fetal fibroblast cell line중 KBFF101과 KBFF201은 Y-specific band가 증폭되지 않음으로 암컷 cell line인 것으로 밝혀졌고 KBFF301과 KBFF401은 Y-specific band(약 210 bp band)를 나타내어 수컷 cell line으로 판명되었다. 네 개의 line 모두에서는 bovine-specific band(약 140bp)을 나타내어 섬유아세포가 한우로부터 확립되었음을 확인할 수 있었다.

2. 확립된 한우 섬유아세포의 Chromosome Karyotyping

분리된 섬유아세포는 karyotyping을 실시하여 염색체의 수와 성, 이상 등을 검사하였다. 분리된 한우 섬유아세포를 약 70% confluent한 상태에서 vinblastin 용액을 넣어 metaphase II에 정지시켜 chromosome을 준비하였다. 소의 chromosome은 총 60개로 이루어져 있고 29개쌍의 상염색체와 1쌍의 성염색체인 X-chromosome과 Y-chromosome으로 구성되어 있다(Fig. 3). 또한 성염색체를 관찰하여 각 cell line의 sex를 규명하였는데 소의 성염색체는 metacentric 모양을 이루고 있고 상염색체는 동원체가 거의 말단부위에 동원체가 있어 거의 acrocentric 형에 가까운 모양을 나타내고 있다. 성염색체의 크기는 X-chromosome이 훨씬 크고 Y-chromosome은 25 또는 26번째의 chromosome과 거의 비슷하여 sex chromosome의 구분에 쉽게 확인되었다(Fig. 2 A와 B).

한우 섬유아세포의 염색체 분석에서는 현미경

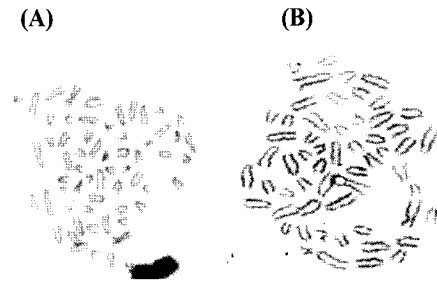


Fig. 2. Chromosome analysis of Hanwoo fetal fibroblast cells. (A) female karyotype, (B) male karyotype.

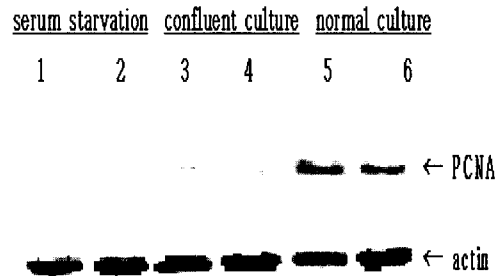


Fig. 3. Western analysis of fetus fibroblast cells with PCNA antibody. Upper band: PCNA, Lower band: actin.

하에서 slide위에서 약 10개의 염색체수를 counting했을 때 60개의 염색체수를 나타내는 비율을 측정하였는데 80% 이상이면 정상으로 간주하였는데 확립된 한우 섬유아세포는 passage no. 10 이상에서도 모두 약 80% 이상이 60개의 염색체 수를 나타내었다(Table 2). 약 10~20%의 세포에서는 염색체수의 변이가 60 ± 4 개로 관찰되었다. 이러한 섬유아세포에서의 계대배양 후 염색체수의 불변화는 핵이식 후 성공적인 복제동물생산과도 일치하는 것으로 일반적으로 핵이식 직전에 karyotyping을 실시하여 정확한 diploid 상태가 유지하고 있는 것을 검사할 필요가 있다(Schieke 등, 1998).

3. 한우 섬유아세포의 세포주기 조절분석

한우 섬유아세포의 cell cycle을 Go stage의 유도하기 위해 두가지 방법을 비교하였는데 serum

Table 2. Percentages of normal karyotype in fetal fibroblast cells isolated from Korean native cattle

Fetal fibroblast cell line	Passge no.	Normal karyotype (%) ^a	Sex
KBFF101	10	(8/10) 80	female
KBFF201	10	(8/10) 80	female
KBFF301	12	(9/10) 90	male
KBFF401	12	(8/10) 80	male

starvation과 confluent한 상태에서 장기간 배양에 의해 유도하였다. 0.5% serum DMEM에서 4~5일 동안 배양하면 대부분의 cell이 Go stage에 도달하였고, 100% confluent한 상태에서 5~7일간 배양하여도 Go 상태에 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 이 cell을 10% serum의 DMEM에 배양을 하면 다시 증식을 재개하게 되는데 이를 통해 Go의 도달을 확인할 수 있다. 분열중인 세포에서 발현되는 PCNA factor의 발현상태를 Western blotting에 의해서 분석해 보았는데 serum starvation과 confluent 배양에 의한 유도 방법이 효율적으로 한우 섬유아 세포를 Go 상태에 도달되는 것으로 판명되었다. Fig. 3에서는 PCNA antibody를 이용하여 Western blotting 방법으로 PCNA의 발현량을 분석하였는데 Go 상태로 유도된 세포에서는 정상적인 분열상태에 있는 세포보다 훨씬 적은 양의 PCNA가 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 serum starvation 방법이 confluent한 상태에서 장기간 배양방법보다 PCNA 발현양이 훨씬 적은 것으로 나타나 좀더 효율적인 Go 상태 세포주기 조절방법으로 나타났다. 소에서 체세포의 세포주기상태와는 복제 효율에 영향을 미치지 않는다는 보고(Cibelli 등, 1998)도 있는 반면, Go 상태 세포주기를 유도하는 것이 *in vitro*에서 수정란을 생산하거나 이식 후 산자 생산율에 영향을 미친다는 보고(Cho, 등, 2002; Katska, 등, 2002; Wells 등, 2003)가 있어 복제동물 생산에 있어서 세포주기 조절에 대한 연구가 좀더 필요한 실정이다.

IV. 요약

본 연구에서는 한우 태아의 시기별로 35일령, 50일령, 70일령 및 90일령의 fetal fibroblast cell line을 생산하였고, bovine-specific primer와 Y chromosome-specific primer를 이용하여 PCR에 의해 성을 판별하여 각각 암수 2 line의 한우 fetal fibroblast cell line을 확립하였다. 이들 cell line을 계대배양하여 passage number가 10 이상에서 염색체 분석을 실시하였는데 모두에서 80%이상의 세포가 60개의 정상 염색체수의 나타내어 계대배양이 karyotype에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Serum starvation과 confluent 배양 방법을 이용하여 Go 상태로 유도되었는지 확인하기 위해 PCNA antibody를 이용하여 Western blotting 분석을 실시하였는데 PCNA 발현이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 다시 정상 medium으로 환원시켰을 때 세포분열이 재개되어 Go 상태로 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한 serum starvation 방법이 confluent한 배양방법보다 PCNA 발현양이 적은 것으로 나타나 좀더 효율적인 Go 상태 세포주기 조절방법으로 판명되었다.

V. 인용문헌

1. Campell, K. H. S., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 49:933-942.
2. Campell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
3. Campbell, K. H. S. and Wilmut, I. 1996. Totipotency or multipotentiality of cultured cells: Applicationas and progress. *Theriogenology*, 47:63-72.
4. Cho, J. K., Lee, B. C., Park, J. I., Lim, J. M., Shin, S. J., Kim, K. Y., Lee, B. D. and Hwang,

- W. S. 2002. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation, *Theriogenology*, 57:1819-1828.
5. Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E. and First, N. 1998. Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. *Theriogenology*, 49:385.
 6. Garry, F., Adams, B., Holland, M. D., Hay, W. W., McCann, J. P., Wagner, A. and Seidal Jr., G. E. 1998. Arterial oxygen, metabolite and energy regulatory hormone concentrations in cloned bovine fetuses. *Theriogenology*, 49:321.
 7. Han, Y. M., Kang, Y. K., Koo, D. B. and Lee, K. K. 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*, *Theriogenology*, 59 :33-44.
 8. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru Y, Kurokawa, K., Kato, J., Doguch, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282:2095-2098.
 9. Katska, L., Bochenek, M., Kania, G., Rynska, B. and Smorag, Z. 2002. Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary cultures established for bovine cloning. *Theriogenology*, 58:1733-1744.
 10. Kill, I. R., Bridger, J M., Campbell, K. H. S., Maldonado-Codina, G. and Hutchison, C. J. 1991. The timing of the formation and usage of replicase clusters in S-phase nuclei of human diploid fibroblasts. *J. Cell Science*, 100:869-876.
 11. Miller, J. R. and Koopman, M. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim. Genet.*, 21:77-82.
 12. Mitalipova, M, Dominko, T., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E. and First, N. 1998. Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology*, 49:389.
 13. Reed, K. C., Matthews, M. E., Mann, D. A., Beaton, S. and Matthews, M. E. 1989. Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides. Patent Cooperation Treaty No. WO 89/07154.
 14. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblast. *Science*, 278:2130-2133.
 15. Stice, S. L., Robl, J. M., Ponce de Leon, F. A., Jerry, J., Golueke, P. G., Cibelli, J. B. and Kane, J. J. 1998. Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunity. *Theriogenology*, 49:129-138.
 16. Vignon, X., Chesne, P., LeBourhis, D., Heyman, Y. and Renard, J. P. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. *Theriogenology*, 49:392.
 17. Wells, D. N., Laible, G., Tucker, F. C., Miller, A. L., Oliver J. E., Xiang T., Forsyth, J. T., Berg, M. C., Cockrem, K., L'Huillier, P. J., Tervit, H. R. and Oback, B. 2003. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, 59:45-59.
 18. Wilmut, I., Schieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campell., K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and mammalian cells. *Nature*, 385:810-814.
- (접수일자: 2003. 1. 12. / 채택일자: 2003. 2. 7.)