

Donor 세포의 종류 및 세포처리에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육*

손준규 · 박정준¹ · 박춘근 · 양부근 · 김정익 · 정희태[†]

강원대학교 동물자원과학대학

Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Following Donor Cell Type and Cell Treatment in Cattle*

Son, J. K., J. J. Park¹, C. K. Park, B. K. Yang, C. I. Kim and H. T. Cheong[†]

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of donor cell type, individual, passage number and trypsinization time on the *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Three cell types (skin, muscle and cumulus cells) and cells from 3 individuals were used for nuclear transfer. Cell were passaged by 5, 15 or 30 times, and cell were trypsinized for 1 or 3 min before injection. Nuclear transfer were performed by conventional fusion method. Development rates to the blastocyst stage were not significantly different among three cell types (16.5~23.9%) and individuals (16.4~19.5%). Blastocyst formation rate of cloned embryos reconstituted with cells at passage 30 (5.8%) was significantly lower than those of embryos reconstituted with 5- and 15-passaged cells (25.3 and 23.5%, respectively, $P < 0.05$). The rate of embryos developed to the blastocyst stage was higher in embryos reconstituted with cells trypsinized for 1 min (30.7%) compared to embryos reconstituted with cells trypsinized for 3 min ($P < 0.05$). The result of the present study indicates that different donor cell types and individuals used in this study did not affect the development of cloned bovine embryos. However, passage number and trypsinization time of donor cells affect the *in vitro* development of cloned bovine embryos.

(Key words : Somatic cell nuclear transfer, Donor cell type, Cell treatment, *In vitro* development, Bovine)

I. 서 론

체세포 핵이식 기술은 유전적으로 동일한 복제동물들 대량 생산하기 위한 기술로서 이미 분화가 이루어진 체세포를 탈핵된 미수정란에 이식하여 핵을 초기화(reprogramming) 시킴으로써 새로운 수정란 및 개체로 발생시키는 기법이다. 1997년 영국의 Wilmot 등이 면양에서 최초로 체세포를 이용한 핵이식에 성공한 이후, 면양(Schnieke 등, 1997), 소(Cibelli 등, 1998; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999; Kubota 등, 2000), 산양(Baguisi 등, 1999) 및 돼지(Bettehauser 등, 2000; Onishi 등,

2000; Polejaeva 등, 2000; Lai 등, 2002)등 가축에서 체세포 복제에 성공하였다. 하지만 핵이식에 의한 복제동물 생산은 높은 난산율과 유산율 및 출생 후 조기사망과 생후 조기 사망의 주원인으로 생각되는 거대산자 증후군(large offspring syndrome) 등의 문제점이 미해결 상태로 남아있고 기술의 효율성도 낮은 수준에 머물러 있어 산업적 이용이 어려운 실정이다.

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산에서 핵이식 기술의 효율에 영향을 주는 요인에는 탈핵, 융합 및 활성화와 같은 기술적인 요인과 공여세포(donor cell)의 기원, 배양상태, 세

* 본 연구는 2003년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

¹ 축산연구소(National Livestock Institute).

[†] Corresponding author : H. T. Cheong, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea. E-mail: htcheong @kangwon.ac.kr

포주기 등 세포학적 요인과, 이식된 핵의 초기화와 관련된 핵-세포질 상호작용 등을 들 수 있다. 특히, donor세포의 종류에 따라서는 복제란의 발육이 영향을 받을 수 있는 것으로 보고 되고 있다. 면양의 경우, 성숙의 유선세포 유래 복제란의 발육능이 태아세포유래 복제란에 비하여 체외발육율이 저조하였으며(Wilmut 등, 1997), 소 체세포의 경우, 난구세포 유래 복제란의 발육능이 난관상피세포 유래 복제란에 비하여 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Kato 등, 1998). 그러나 개체의 연령에 따라서는 40일령의 태아 유래 세포와 21년령의 성숙 유래 세포를 이용한 비교 실험에서 배반포까지의 발육율에 차이가 없는 것으로 보고되었다(Hill 등, 2000).

한편, Donor 세포의 passage 수에 따른 영향을 검토한 보고는 많지 않으나, Campbell 등(1996)은 면양의 수정란 유래 배양세포를 6~13회 passage하여 핵이식 한 결과, passage 간 발육율의 차이를 보이지 않았다. 토끼 태아세포 핵이식에서도 복제란의 분할율은 passage 수 (2~8회)에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Galat 등, 1999). 그러나 donor 세포의 passage를 수십 회 이상 반복할 경우 세포의 형태 및 분할능력에 나쁜 영향을 미칠 것으로 예상되며, 그에 따른 핵이식란의 발육도 영향을 받을 것으로 사료된다. 이 외에도 핵이식 전 배양된 체세포의 회수를 위해 이용되는 trypsin 처리 시간 등에 따라서는 핵이식 후 복제란의 발달에 영향을 받을 수 있을 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 체세포의 종류, 세포 제공 개체, passage 수 및 trypsinization 시간에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육능을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난포의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 16~24시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체세포의 준비

피부 및 근육세포는 한우 암소의 귀 조직으로부터 회수하였고, 난구세포는 동일개체 유래의 성숙된 난자-난구세포 복합체로부터 회수하였다. 회수된 세포는 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 µg/ml gentamicin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco-BRL)액 내에서 배양하여 약 4회 정도 passage 한 후 동결보존 하였다가 핵이식에 사용하였다. 용해된 세포는 핵이식 전에 4-well dish에서 약 1주일간 배양하여 confluency 상태를 만들어 줌으로써 G0/G1기에 동조를 유도하였다.

3. 미수정란의 탈핵

모든 미세조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 mineral oil로 피복된 cytochalasin B(CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양 소적(50 µl) 내에서 실시하였다. 체외에서 18~20시간 성숙시킨 난포란의 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 µg/ml의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵여부를 검사하였다.

4. 핵이식, 전기융합 및 활성화

핵이식 조작은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 배양 체세포는 0.05% trypsin- EDTA용액으로 1~3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하여 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하며 사용하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5-mm폭의 wire chamber를 이용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 µs 간 1회 통전하여 융합을 유기하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 10 µM의 Ca⁺⁺-ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 µg/ml 농도의 2 mM의 6-dimethylaminopurine(6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유기하였다.

5. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 µl drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여, 극체 방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

6. 실험설계

실험 1) 성체 피부세포, 난구세포 및 근육세포를 이용하여 핵이식 후 세포형태별 복제란의 체외 발육능을 검토하였다.

실험 2) 한우 3개체의 피부세포를 이용하여 핵이식 후 복제란의 개체별 체외 발육능을 검토하였다.

실험 3) 동일 개체로부터 얻어진 피부세포를 각각 5, 15 및 30 passage 별로 나누어 핵이식하여 passage 수에 따른 복제란의 발육능을 검토하였다.

실험 4) Donor 세포를 0.05% trypsin-EDTA용액에 각각 1분 과 3분 처리 후 핵이식하여 trypsin 처리 시간에 따른 복제란의 발육능을 검토하였다.

7. 통계처리

실험의 결과는 Duncan의 다중검정 및 LSD 검정에 의해 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 체세포 종류별 핵이식

소의 피부세포, 난구세포 및 근육세포를 이용하여 핵이식한 결과, 난구세포를 이용한 경우 2세포기(84.8%) 및 상실배(38.0%)의 발육율이 피부세포를 이용한 경우보다 유의적으로 높게 나타났으나($P < 0.05$), 배반포 발육율에서는 각각 17.9%, 23.9% 및 16.5%로 유의적인 차이가 인정되지 않았다 (Table 1).

2. 체세포 개체별 핵이식

한우 3개체(YS, TW 및 Kuk)에서 피부세포를 회수하여 핵이식한 결과, 분할율에서는 Kuk(84.8%)으로부터 회수한 피부세포를 이용한 경우 YS(74.8%)보다 유의적으로 높은 비율을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 상실배기 발육율은 21.9~24.4%, 배반포 발육율은 16.4~19.5%로, 3개체간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 2).

3. Passage 수에 따른 핵이식

Donor 세포의 passage 수를 5회(P5) 와 15회(P15)까지 반복한 경우, 핵이식 후 배반포 형성율(23.5~25.3%)이 저하되지 않았으나, 30회(P30)까지 반복하였을 경우에는 P5 및 P15

Table 1. Development of cloned bovine embryos reconstituted with different donor cell types

Type of cells*	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
Skin	111	7(71.2) ^a	28(25.2) ^a	25(17.9)
Cumulus	92	78(84.8) ^b	35(38.0) ^b	22(23.9)
Muscle	115	89(77.4) ^{ab}	36(31.3) ^{ab}	19(16.5)

* Skin and muscle cells were derived from same individual, but cumulus cells were derived from another individual.

^{ab} Values with different superscripts in the same column differ ($P < 0.05$).

Table 2. Development of cloned bovine embryos reconstituted with donor cells derived from different individuals*

Individuals	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
YS	151	113(74.8) ^a	33(21.9)	27(17.9)
TW	256	207(80.8) ^{ab}	62(24.2)	50(19.5)
Kuk	269	228(84.8) ^b	62(23.0)	44(16.4)

* Skin cells derived from each individuals were used for nuclear transfer.

^{ab} Values with different superscripts differ ($P < 0.05$).

에 비하여 유의적($P<0.05$)으로 낮은 배반포 형성율(5.8%)을 나타내었다(Table 3). 또한 passage를 오래 반복할 경우에는 세포의 doubling time 및 형태에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다(미제시).

4. 체세포의 trypsinization 시간에 따른 핵이식

동일개체의 체세포를 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 각각 1분과 3분간 처리 한 결과, 1분간 처리하였을 때(30.7%)가 3분간 처리 하였을 때(19.2%) 보다 배반포 형성율이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 한편, trypsin으로 1분간 처리 하였을 때의 융합율(43.8%) 보다 3분간 처리하였을 때가 51.7%로 다소 높은 융합율을 나타냈지만 유의적인 차이는 없었다(Table 4).

IV. 고 찰

체세포를 이용한 복제동물 생산 연구에서 배유래 세포, 섬유아세포, 유선세포, 난구세포, 백혈구, 과립 세포, 생식세포, 간세포와 같이 다양한 형태의 세포가 donor세포로 이용되어져 왔다(Brem 등, 2002). 그러나 이러한 세포 중 어떤 것이 핵이식에 이용 시 가장 높은 성공률을 보이는지는 아직

명확하지 않다. Kato 등 (2000)은 소의 성체, 신생아와 암·수태아 유래의 다양한 체세포를 이용한 핵이식 실험에서 배반포 발육율은 태아 근육세포와 성체 간세포의 극단적인 경우를 제외하고는 유의적인 차이가 없음을 보고하였다. 이와 유사한 결과가 생쥐의 다른 종, 성별 및 나이에 따른 다양한 형태의 세포를 이용하였을 때 나타났다(Wakayama 등, 2001). 그러나 Kato 등 (1998)이 진행한 최초의 체세포 복제 소 생산 연구에서 난구세포가 난관세포에 비하여 배반포 발육율이 높은 것으로 보고하고 있어 세포의 종류에 따른 발육능의 차이가 어느 정도 인정된다고 판단된다. 다만, 본 연구에서는 체세포의 종류에 따른 복제 수정란의 생산에서 피부세포, 난구세포 및 근육세포의 핵이식 결과, 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 타 세포에 대한 난구세포의 비교우위도 확인할 수 없었다.

한편, 본 연구에서는 개체간의 비교에 있어서도 동일한 종류의 세포를 사용할 경우에는 핵이식란의 발육율에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 Kato 등 (1998)의 연구 결과에서 보듯이 동일개체의 세포 line 간에도 발육율에 차이가 있는 점으로 볼 때 개체 간 차이도 존재할 수 있는 것으로 판단된다.

Donor 세포의 유전적 손상은 체외에서 계대 배양하는 동안에 발생할 수 있다. 그래서 신선 세포 또는 단기간 배양

Table 3. Effect of passage number of donor cells on the development of cloned bovine embryos*

No. of Passage	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
P5	142	125(88.0)	53(37.3) ^a	36(25.3) ^a
P15	136	116(85.3)	46(33.8) ^{ab}	32(23.5) ^a
P30	138	112(81.2)	28(20.3) ^b	8(5.8) ^b

* Skin cells derived from same individual were used for nuclear transfer.

^{ab} Values with different superscripts in the same column differ ($P<0.05$).

Table 4. Effect of trypsinization time of donor cells on the development of cloned bovine embryos*

Trypsinization time	No. of eggs manipulated	No. (%) of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
			2-Cell	Molura	Blastocyst
1 min	255	127(49.8)	115(90.6)	53(41.7) ^a	39(30.7) ^a
3 min	292	151(51.7)	126(83.4)	46(30.5) ^b	29(19.2) ^b

* Skin cells derived from the same individual were used for nuclear transfer.

^{ab} Values with different superscripts in the same column differ ($P<0.05$).

(<10 passage)한 donor 세포가 복제동물 생산을 위해 주로 사용되어 왔다(Wilmot 등, 1997; Cibelli 등, 1998; Chesne 등, 2002). 그러나 Kubota 등 (2000)은 10회 또는 15회 계대 배양한 소 체세포 유래 핵이식란이 5회 계대 배양된 세포 유래 난자보다 배반포 형성율이 더 높았다고 보고하였다. Arat 등 (2001)도 소의 과립세포를 15회 계대 배양한 경우 10~13회 계대 배양된 경우 보다 복제란의 발육율이 더 높았다고 보고하였다. 본 연구에서는 Donor 세포의 passage 수가 15회까지는 발육능에 차이가 없어 위의 연구들과 다소 다른 결과를 보였다. 또한, passage를 30회까지 반복할 경우에는 발육능이 유의적으로 저하되었고, 세포의 형태에도 악 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 판단 지표로 삼은 passage 수는 세포의 population doubling(PD)과는 일치하지 않으며, 실제 PD 수는 passage 수의 2~3배에 이를 것으로 추산된다. 따라서 P30의 경우는 이미 세포의 수명이 한계에 이른 것으로 판단되며, 이러한 이유로 핵이식 후 복제란의 발육능이 저하된 것으로 사료된다.

배양 중인 세포에 trypsin 처리시간의 영향을 검토한 연구 결과는 아직 보고되지 않았다. 세포의 trypsin 감수성이 똑같고 모든 세포가 똑같은 시간의 trypsin 처리로 분리가 된다면 문제는 없지만, 동일한 세포 주에서도 개개의 세포에 따라 trypsin 감수성에 차이가 있을 수 있기 때문에 trypsin 처리가 불충분하면 비교적 접착력이 강한 세포집단은 회수가 어렵고 접착력이 약한 세포만 회수가 가능하다. 반대로, 강하게 접착한 세포가 완전히 분리되기까지 trypsin 처리를 지속한다면 trypsin 감수성이 높아, 이미 떨어져 나온 세포는 trypsin에 의해 세포막의 소화가 진행될 것이다. 따라서 trypsin 처리 시간을 연장하여 대부분의 세포를 회수하려고 할 경우 오히려 핵이식란의 발육에 나쁜 영향을 미칠 수 있는 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 소 체세포 핵이식란의 발육이 체세포의 종류 및 세포 제공 개체에 따라서는 영향을 받지 않으나, passage 수 및 체세포의 trypsinization 시간에 따라서는 영향을 받을 수 있음을 시사한다. 따라서 donor 세포는 passage 수가 15회를 넘지 않는 체세포를 되도록 짧은 시간 동안 trypsin 처리하여 회수한 후 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

V. 요약

본 연구는 체세포의 종류, 세포 제공 개체, 계대배양 수

및 세포의 trypsin 처리시간이 소 체세포 핵이식란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. 세 종류의 체세포(피부, 근육 및 난구세포)와 암소 3 개체를 실험에 공시하였으며, 한 개체 유래의 피부세포는 5~30회 계대배양하였고, 핵이식 전에 1~3분간 trypsin 처리하여 핵이식에 사용하였다. 핵이식 과정은 상법에 따라 전기융합법을 이용하였다. 핵이식란의 배반포 발육율은 세포의 종류(16.5~23.9%)나 개체 간(16.4~19.5%)에 차이가 없으나, 30회 계대 배양한 세포를 사용한 경우(5.8%)에는 5회(25.3%) 또는 15회(23.5%) 계대 배양한 세포를 사용한 경우에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 또한, 1분간 trypsinization 한 세포를 사용한 경우(30.7%)는 3분간 trypsinization 한 경우에 비해 배반포 발육율이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 본 연구의 결과는 소 체세포 핵이식란의 발육이 체세포의 종류 및 세포 제공 개체에 따라서는 영향을 받지 않으나, passage 수 및 체세포의 trypsinization 시간에 따라서는 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

VI. 인용문헌

1. Arat, S., Rzucidlo, S. J., Gibbons, J., Miyoshi, K. and Stice, S. L. 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 60:20-26.
2. Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17:456-461.
3. Bethausser, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Genskow, M. P., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. and Bishop, M. 2000. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nature Biotech.* 18:1055-1059.
4. Brem, G. and Kuhholzer, B. 2002. The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells* 4:57-63.
5. Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmot, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a

- cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
6. Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J. P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech.* 20:366-369.
 7. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce de Leon, F. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
 8. Galat, V. V., Lagutina, I. S., Mesina, M. N., Chernech, V. J. and Prokofiev, M. I. 1999. Developmental potential of rabbit nuclear transfer embryos derived from donor fetal fibroblast. *Theriogenology* 51:203 (abstr.).
 9. Hill, J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson, J. A. and Westhusin, M. E. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62:1135-1140.
 10. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
 11. Kato, Y., Tani, T. and Tsumoda, 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.
 12. 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.
 13. Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. and Prather, R. S. 2002. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
 14. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
 15. Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
 16. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scoot, 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 fibroblasts. *Science* 278:2130-2133.
 17. Wakayama, T. and Yanagimachi, R. 2001. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 58:376-383.
 18. Westhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, R., Looney, C. R. and Bonodioli, K. R. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. *J. Reprod. Fertil.* 95:475-480.
 19. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
 20. Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cell. *Biol. Reprod.* 60: 996-1005.
- (접수일자: 2004. 1. 23. / 채택일자: 2004. 2. 28.)