

체세포 복제돼지 생산에 있어서 대리모의 선발과 배란상태 분석

현상환¹ · 정언우* · 이은송** · 김현욱* · 김근형 · 정의배

충북대학교 수의과대학

*서울대학교 수의과대학, **강원대학교 수의학과

Selection of Surrogates and Analysis of Its Ovulation Status for the Production of Somatic Cell Cloned Piglets

Sang-hwan Hyun¹, Yeon-woo Jeung*, Eun-song Lee**, Hyun-wook Kim*,
Gon-hyung Kim and Eui-bae Jeung

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

(게재승인: 2006년 4월 5일)

Abstract : Production of cloned pigs by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has unlimited value for developing critical biotechnology such as xenotransplantation. Various efforts have been made to establish this technology, and several litters of live piglets have been produced after transfer of SCNT embryos. However, the efficiency is very low compared to piglet production by artificial insemination or natural mating. So far, most studies have been limited to in vitro production of SCNT embryos. This study was conducted to standardize a surrogate recipient (gilts) for transfer of SCNT embryos to improve pregnancy rate. Potential surrogate gilts over 7 months of age were checked for their estrous status by observing external signs; vaginal fluid, vulva redness, vulva swelling, and standing response to back pressure. Viscosity of vaginal fluid was evaluated and classified as none (0), medium (1), and strong (2). Vulva redness and swelling was respectively assessed by none or shrink (0), medium (1), strong (2). Back pressure was estimated by an immediate move (0), standing less than 10 sec (1), and standing over 10 sec (2). And then ovulation status of each surrogate was classified as pre-ovulation (PO-17 surrogates), just prior to ovulation (JPO-20 surrogates), in ovulation (IO-12 surrogates), just after ovulation (JAO-14 surrogates) and after ovulation (AO-24 surrogates) at the time of surgery for embryo transfer (ET). Real-time ultrasonographic scanners have been used for pregnancy diagnosis by observing amniotic vesicles. The first pregnancy diagnosis was done on Day 30 after ET and then repeated 2-week interval. In the results, SCNT embryos transferred into JPO surrogates gave better pregnancy rates (45%) than others (4% to 11%) on Day 30 after ET. These result indicates that surrogate gilts in a status just prior to ovulation can offer optimal condition to establish pregnancy by transfer of SCNT pig embryos.

Key words : somatic cell nuclear transfer, embryo transfer, ovulation status, pregnancy, pig.

서 론

체세포 핵이식 방법을 통한 복제 돼지의 생산은 유전적으로 우수한 개체를 동일하게 생산할 수 있을 뿐만 아니라 체세포를 유전적으로 유용한 형질로 전환하여 치료용 세포 개발, 조직 및 이종 장기 개발, 단백질 의약품 개발 등 무한한 잠재성과 학문적 가치를 가진 것으로 주목받고 있다 (10). 최초로 Robl과 First(17)가 돼지 수정란의 전핵 및 2

세포기 할구 치환 실험을 보고한 이래 복제 돼지의 생산은 2000년에 이르러 세 그룹에서 보고되었다. Polejaeva 등 (11)은 탈핵된 체내 성숙난자를 수핵난자로 이용, 핵이식을 한 후 형성된 전핵을 다시 탈핵한 체내 수정란으로 이식하여 다섯 마리의 복제 돼지 산자를 생산하였으며, Onishi 등(9)은 탈핵된 체내 성숙란의 세포질 안으로 공여 체세포의 핵을 미세주입하여 'Xena'를 보고하였다. 이에 반해 Betthausser 등(2)은 최초로 체외 성숙난자를 수핵난자로 사용하여 복제 돼지를 생산함으로써 대량 생산의 가능성을 열게 되었다. 이후 전 세계적으로 체세포 복제 돼지 연구는 다각도로 진행되어 인체 이식용 장기 생산을 목

¹Corresponding author.
E-mail : shhyun@cbu.ac.kr

적으로 하는 돼지의 형질전환 기술과 녹아웃(knock-out) 기술을 이용한 면역거부반응 억제 돼지 생산 기술에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(4,7).

그러나 체세포 핵이식 방법을 이용하여 생산된 복제배아를 대리모의 난관 및 자궁에 이식한 후의 초기 임신율, 복제산자의 생산율 및 생존율은 매우 낮은 효율을 보이고 있다. 이러한 낮은 생산 효율은 복제 돼지 생산에 있어서 여러 요인들이 복합적으로 작용하기 때문이다(6). 이러한 요인으로는 공여난자의 종류, 융합 및 활성화 조건, 공여핵 세포의 세포주기 동기화 방법, 공여핵원의 종류, 복제배아 이식 후 체내 발육과 임신유지 및 분만에 따른 신생 자돈의 생존성의 차이 등으로 나눌 수 있다. 그러나 현재까지 체세포 핵이식 기술을 이용한 복제 돼지 생산에 관한 대부분의 연구는 산자생산에 영향을 미치는 요인들 중 주로 시험관내 복제배아 작성방법에 대해 이루어져 왔다. 돼지 수정란이식에 관한 연구로는 주로 돼지의 번식 생리와 수정란이식 방법에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 복제배아의 대리모 난관 및 자궁으로의 이식 과정에 관련된 연구결과는 전무한 실정이다(1,3, 12,14). 위에서 열거된 요소뿐만 아니라 대리모 선발 및 복제배아 이식수술, 그리고 대리모의 관리 및 분만 후 사양관리 등 수 많은 요소들이 최상의 조건으로 각각 부합 시 복제돼지 생산 효율이 향상되리라 사료된다.

본 연구에서는 체세포 핵이식 기술을 이용한 복제 돼지 생산에 있어서 자연발정주기를 보이는 대리모의 외형적 발정 상태에 따른 난소의 배란 상태를 확인하였다. 배란상태에 따른 복제배아 이식 및 초기 임신율의 관계를 확인하여 복제배아 이식시 정확한 적기의 대리모를 외형적 발정 상태만으로 선발할 수 있는 기준을 제시하여 복제배아 이식의 효율성을 향상시키고자 수행하였다.

재료 및 방법

발정 상태의 확인

대리모는 7개월령 이상 그리고 90 kg의 이상의 미경산돈을 사용하였다. 대리모의 외부 발정 징후는 Soede와 Kemp의 방법에 따라 외부 생식기관에 대한 평가와 둔부 압박을 통한 대리모의 움직임 반응으로 구분하여 평가하였다(19). 발정에 따른 외부 생식기 징후로는 여러 가지 외부 생식기의 변화 중에서 질점액의 점도 및 분비량, 외음부의 발적 및 종창을 관찰하고 평가하였다. 평가 기준은 질액의 점도 및 분비량은 없음, 중간, 강함의 세 단계로 평가하였다. 외음부의 발적 및 종창 평가 기준의 경우, 없음, 중간, 강함의 세 단계로 분류하였다. 둔부 압박은 실험자가 대리모의 둔부를 양손으로 눌러서 움직이는 정도로 교배 허용 자세를 평가하였다. 평가기준으로는 즉시 움직임, 10초간 정지, 10초 이상 움직임 없음의 세 단계로 평가하였다.

배란 상태의 확인

대리모의 외부발정 징후에 따른 배란 상태의 확인은 복제

배아 이식 시 난소의 난포 상태를 육안으로 평가하였다. 배란 상태는 배란전(pre-ovulation), 배란직전(just prior to ovulation), 배란중(in ovulation), 배란직후(just after ovulation), 배란후(after ovulation)의 다섯 군으로 나누어 확인하였다. 난포의 크기와 육안 상 난포 막의 색깔로써 결정하였다. 난포 3~5 mm 크기와 난포 막이 분홍색에 가까운 난포가 존재 할 때 배란 전으로 판정하였고 난포 5~8 mm 크기와 난포 막이 붉은색 난포가 존재할 경우에는 배란 직전으로 평가하였다. 배란 후 형성된 적체가 존재하고 배란직전 5~8 mm 크기의 난포가 동시에 존재하는 경우를 배란중으로 평가하였다. 배란 후 형성된 적체가 존재하지만 배란직전의 난포가 없는 경우는 배란직후로, 배란 후 형성된 황체가 육안적으로 확인되었을 경우를 배란후로 평가하였다.

복제배아 이식, 배란 상태 확인 및 임신진단

체세포 복제배아의 생산은 Hyun 등의 방법을 이용하였다(6). 복제배아는 발정징후가 발현된 당일 대리모의 난관에 이식하였다. 외과적 이식 수술을 위한 전마취는 ketamin (2 mg/kg), xylazine (1 mg/kg)의 조합으로 유도하였으며 본 마취는 3% isoflurane을 사용하였다. 대리모를 앙와 자세로 보정 후 복부의 정중부위를 절개하여 자궁을 견인, 체외로 노출하였다. 각 발정상태별로 난포의 크기, 황체의 유무, 난소의 배란 상태 및 자궁의 상태를 평가하였다. 배란 상태의 확인 후 gamete intrafallopian transfer (GIFT) 카테터를 이용하여 120~230개의 복제배아를 대리모 난관내로 이식하였다. 임신 진단은 복제배아 이식 후 30일에 초음파 검사를 통하여 임신 여부를 판단하였다.

자료처리 및 분석

실험 결과는 대리모수에 대한 평균으로 표시하였으며 자료는 SPSS program을 사용하여 분석하였다. 각 실험에 따른 통계적 유의성 ($P < 0.05$) 검사는 비모수 검정의 Kruskal-Wallis 검정을 사용하였다.

결 과

배란상태에 따른 대리모의 초기 임신율

전체 대리모는 총 87두로써 배란전이 17두, 배란 직전이 20두, 배란중이 12두, 배란직후가 14두 그리고, 배란후가 24두로 판정되었다(Table 1). 수정란 이식 후 30일의 초기 임신율은 전체 87두의 대리모 중에서 14두가 임신되어 16.1%를 보였다. 배란직전의 대리모에서는 45%로 다른 대리모 집단(배란전 11%, 배란중 8%, 배란직후 7%, 배란후 4%)보다 높은 임신율을 보였다.

대리모의 외부 발정징후 중 질점액 점도 및 분비량 양상과 배란상태 분석

각 배란상태 별 질점액 점도 및 분비량 양상을 보면

Table 1. Pregnancy result from the various ovulation status of surrogates

	Ovulation status of surrogates				
	PO ^A	JPO ^B	IO ^C	JAO ^D	AO ^E
No. of Surrogates	17	20	12	14	24
No. of 30 day pregnancy	2	9	1	1	1
Pregnancy rate (%)	11.7	45.0	8.3	7.1	4.1

^APre-ovulation group, ^BJust-prior to ovulation group, ^CIn ovulation group, ^DJust after ovulation group, ^EAfter ovulation group.

Table 2. Correlation between the viscosity of vaginal fluid and the ovulation status of surrogates

Ovulation status	No. of surrogates	No. of the viscosity vaginal fluid status(%)		
		None	Medium	Strong
PO ^A	17	2(1.2)	7(41.1) ^a	8(47.0) ^a
JPO ^B	20	0(0)	2(10.0) ^b	18(90.0) ^b
IO ^C	12	0(0)	3(25.0) ^b	9(75.0) ^b
JAO ^D	14	1(7.1)	4(28.5) ^b	9(64.2) ^{ab}
AO ^E	24	2(4.1)	15(62.5) ^a	7(29.1) ^{ac}

^{a,b,c} Within the same column, values with different superscripts differed significantly ($P < 0.05$).

^APre-ovulation group, ^BJust-prior to ovulation group, ^CIn ovulation group, ^DJust after ovulation group, ^EAfter ovulation group.

(Table 2), 배란직전 상태 (90%)의 대리모 질점액 점도 및 분비량은 배란중인 군 (75%)과 유의적 차이는 없으나 다른 군 (배란전 47%, 배란직후 64%, 배란후 29%)에 비하여 유의적으로 강함을 보여주고 있다. 배란전과 배란후의 대리모의 경우, 질점액 점도 및 분비량은 다른 군에 비하여 중간급에 상대적으로 많이 분포함을 나타내고 있다.

대리모의 외부발정 징후 중 외음부 발적 및 종창 양상과 배란상태 분석

각 배란상태 별 외음부 발적 및 종창 양상을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 배란직전 (95%)의 대리모군이 다른 군 (배란전 70%, 배란중 66%, 배란직후 57%, 배란후 57%, 배란후 20%)에 비하여 유의적으로 강하게 외음부가 발적되고 종창됨을 보여주고 있다. 배란후의 대리모의 경우에는 다른 군에 비하여 외음부 종창이 줄어들어 중간정도나 전무한 상태를 보였다.

대리모의 외부 발정징후 중 둔부압박에 대한 반응 결과와 배란상태 분석

둔부 압박에 대한 대리모의 반응 결과는 Table 4와 같다. 배란중인 군 (66%)과 유의적 차이는 없으나 배란직전 (85%)의 대리모는 둔부 압박 후 10초 이상 움직임 없이 교배 허용 자세를 취하는 결과가 다른 군 (배란전 53%, 배란직후 42%, 배란후 33%)에 비하여 유의적으로 높은 결과를 보여주고 있다.

고 찰

핵 이식 기술에 의한 복제 돼지의 생산은 이중 장기 이식과 같은 생물공학의 발전에 있어서 무한한 가치를 갖는다. 돼지 복제 배아의 생산을 위한 시험관내 기술은 많은 연구진에 의해 개선 중이며, 핵이식 기술에 의한 복제란 이식을 통한 복제돼지의 생산도 이루어 졌다(2,6,9,11). 성공적인 복제돼지를 생산하는데 있어 미성숙 난자의 성숙과정, 공여핵

Table 3. Correlation between the vulva redness-swelling and the ovulation status of surrogates

Ovulation status	No. of surrogates	No. of the vulva redness-swelling(%)		
		None or shrink	Medium	Strong
PO ^A	17	1(5.9)	4(23.5) ^a	12(70.6) ^a
JPO ^B	20	0(0)	1(5.0) ^b	19(95.0) ^b
IO ^C	12	0(0)	4(33.3) ^a	8(66.7) ^a
JAO ^D	14	1(7.1)	5(35.7) ^a	8(57.1) ^a
AO ^E	24	6(25.0) ^a	13(54.2) ^c	5(20.8) ^c

^{a,b,c} Within the same column, values with different superscripts differed significantly ($P < 0.05$).

^APre-ovulation group, ^BJust-prior to ovulation group, ^CIn ovulation group, ^DJust after ovulation group, ^EAfter ovulation group.

Table 4. Correlation between the back pressure response and the ovulation status of surrogates

Ovulation status	No. of surrogates	No. of the back pressure response(%)		
		Immediate move	Standing less than 10 sec	Standing over 10 sec
PO ^A	17	3(17.6) ^a	5(29.4) ^a	9(53.0) ^a
JPO ^B	20	1(5.0) ^b	2(10.0) ^b	17(85.0) ^b
IO ^C	12	0(0) ^b	4(33.3) ^a	8(66.7) ^{ab}
JAO ^D	14	4(28.6) ^a	4(28.6) ^a	6(42.8) ^a
AO ^E	24	7(29.2) ^a	9(37.5) ^a	8(33.3) ^a

^{a,b,c} Within the same column, values with different superscripts differed significantly ($P < 0.05$).

^APre-ovulation group, ^BJust-prior to ovulation group, ^CIn ovulation group, ^DJust after ovulation group, ^EAfter ovulation group.

원인 체세포의 배양과정 및 핵이식 과정 등 시험관내 요인들로부터 대리모 준비, 복제배아 이식, 임신유지 및 분만까지의 임상적 요소까지 수많은 요인들이 돼지 핵이식란의 체내생존성에 영향을 미치고 있다. 그러나 복제 돼지의 생산은 매우 낮은 효율을 보이고 있다. 본 연구는 체세포 핵이식 기술에 의한 복제 돼지 생산 시 자연적인 발정주기를 보이는 대리모에서 배란 상태에 따른 수태율의 관계를 확인하여 복제란 이식의 효율성을 높일 수 있는 방법을 찾아보고자 수행하였다.

돼지는 번식학적으로 다태 동물이며 최소 4두 이상이 착상되어야만 임신이 유지되어 분만까지 진행될 수 있다(13). Pope 등은 7일째 수정란을 발정 6일째 대리모돈에 이식했을 때 생존성이 높다고 보고하였다(15). 이는 공여 수정란의 주기와 대리모의 발정주기를 1일 비동기화하는 방법이 산자 생산에 효율적임을 시사한다. 현재까지의 핵이식 방법에 의한 배반포 형성율은 9~14% 내외로 극히 저조하다(5). 시험관내 성적에 비추어 한 두의 대리모로부터 최소 15두의 복제돼지를 생산하기 위해서는 150개 이상 많은 수의 복제배아를 이식했을 때 비로소 목적했던 바의 복제 돼지를 생산할 수 있게 된다. 본 연구에서 배란상태별 초기 임신율을 조사한 결과 (Table 1) 배란 직전 (45.0%)이 다른 대리모 집단 (배란 전 11.1%, 배란중 8.3%, 배란직후 7.1%, 배란후 4.1%)보다 높은 임신율을 보였다. 이러한 결과는 체세포 핵이식에 의한 복제배아 이식시 발정기 중 대리모의 배란상태 조건은 배란 직전이 복제배아 이식에 최적의 시기임을 나타낸다. 본 연구에 사용된 복제배아는 핵이식 융합 및 활성화 처리 후 24시간 이내 배양 상태인 전핵단계에서 2 세포기까지의 복제배아를 대리모의 난관내로 이식한 후에 얻어진 결과이다. 즉, 복제배아의 2세포기 단계가 배란직전 대리모 자궁의 상태보다 1~2일 정도 이른 발달 상태의 복제배아를 이식하였다. 이러한 결과는 Weibel 등(20)과 Polge(13)의 돼지 수정란 이식에 관한 연구 결과와 일치한다. Lee 등은 시험관내 작성된 수정란이나 복제배아는 체내 유래 수정란보다 더디게 발육됨을 보고하였다(8). 따라서 체세포 핵이식에 의해 생산된 복제배아 이식도 대리모와 복제배아의 세포주기가 1~2일의 시간적 차이를 갖는 비동기화 복제배아 이식수술이 임신율의 향상을 가져오리라 사료된다.

대리모의 발정시의 외부징후로 배란상태를 쉽게 확인할 수는 없지만 점진적인 행동 변화 (활동성의 증가, 식욕 저하, 승가 행동, 수컷과 같은 행동)와 생리적인 변화(외음부의 발적 및 종창, 질 액의 점도 증가)를 보이게 된다(19). 또한 발정시의 외부징후의 변화는 경산돈보다는 미경산돈에서 더 중요한 발정의 지표로 사용될 수 있다(21). 각 배란상태 별 질점액 점도 및 분비량 양상을 보면 (Table 2), 배란직전의 대리모군이 다른 군에 비하여 유의적으로 강함을 보여주고 있다. 외음부 발적 및 종창 양상 결과 (Table 3)는 배란직전의 대리모군이 다른 군에 비하여 유의적으로 강하게 외음부가 발적되고 종창됨을 보여주고 있다. 배란후의 대리모의 경우에는 다른 군에 비하여 외음부 종창이 줄어들어 중간정도나 전무한 상태를 보였다. 둔부 압박에 대한 대리모의 반응 결과는 배란중 (66%)군과 유의적 차이는 없으나 배란직전 (85%)의 대리모는 둔부 압박 처치 후 10초 이상 움직임 없이 교배 허용 자세를 취하는 결과가 다른 군에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타내었다 (Table 4). 이상의 외부징후와 배란상태와의 관계를 조사한 결과 배란직전의 대리모 집단이 강한 외부 발정징후를 보이는 것을 알 수 있다. 하지만 발정 시 외부 생식기관의 변화는 발정 시작 전 2-6일 전부터 나타나기 시작하고(18), 발정 시 돼지에서의 생리적인 변화 (질점액 점도, 외음부 종창 및 발적, 체온, 질 온도)로 배란 시기를 찾는 것은 효율이 낮다고 보고 되었다(16,19). 본 연구 결과 배란직전의 대리모가 다른 집단들보다 뚜렷한 외부징후를 보이지만 다른 대리모 집단에서도 외부 발정징후를 강하게 나타내는 경우가 관찰되었다. 그러므로 외부 징후에만 의존하여 배란직전의 대리모를 선택하는 경우에는 세심한 주의가 필요하다고 사료된다. 본 연구 결과와 같이 배란직전의 대리모를 선택하기 위해서 관찰한 세 가지 외부 징후 중 한가지나 두 가지만 강하게 나타내는 대리모보다는 세 가지 (질점액 점도 및 분비량, 외음부 발적 및 종창, 둔부압박)의 외부징후 모두를 강하게 충족한 대리모를 선택한다면 복제배아 이식 후 임신효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구결과를 종합해 볼 때 복제돼지 생산에 있어서 복제배아 이식수술시 발정중인 대리모의 배란상태가 중요한 요인인 것으로 사료된다. 자연 발정 주기를 보이는 대리모 중

에서 배란직전의 대리모를 선택하기 위해서는 질점액 점도 및 분비량, 외음부 발적 및 종창, 둔부 압박에 대한 반응 등 전형적인 외부 발정징후를 강하게 나타내는 대리모를 선택하여야 한다. 또한 배란직전의 난소를 가진 대리모를 준비하는 것이 보다 높은 복제 돼지 생산효율을 가져오게 될 것으로 사료된다. 앞으로 배란직전의 대리모를 좀 더 정확하게 선택하기 위해서는 혈청 호르몬 검사를 통한 배란 상태의 확인과정이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 체세포 핵이식 기술을 이용한 복제 돼지 생산에 있어서 배란상태에 따른 복제배아 이식 및 초기 임신율의 관계를 확인하여 복제배아 이식시 정확한 적기의 대리모를 외형적 발정 상태만으로 선발할 수 있는 기준을 제시하여 복제배아 이식의 효율성을 향상시키고자 수행하였다.

1. 배란상태에 따른 대리모의 초기 임신율은 배란직전의 대리모에서는 45%로 다른 대리모 집단보다 높은 임신율을 보였다.

2. 대리모의 외부 발정징후 중 질점액 점도 및 분비량 양상과 배란상태 분석 결과로서 배란직전 상태의 대리모 질점액 점도 및 분비량은 배란중인 군과 유의적 차이는 없으나 다른 군에 비하여 유의적으로 강함을 나타내었다.

3. 대리모의 외부발정 징후 중 외음부 발적 및 종창 양상과 배란상태 분석 결과, 배란직전의 대리모군이 다른 군에 비하여 유의적으로 강하게 외음부가 발적되고 종창됨을 보였다.

4. 대리모의 외부 발정징후 중 둔부압박에 대한 반응 결과와 배란상태 분석 결과로서 배란중인 군과 유의적 차이는 없으나 배란직전의 대리모는 둔부 압박 후 10초 이상 움직임 없이 교배 허용 자세를 취하는 결과가 다른 군에 비하여 유의적으로 높은 결과를 보여주고 있다.

이상의 결과를 통하여 체세포 복제돼지 생산에 있어서 복제배아 이식수술시 발정중인 대리모의 배란상태가 중요한 요인이며, 발정중인 대리모 중에서 배란직전 상태가 체세포 복제 배아 이식의 적기임을 알 수 있었다. 또한 임신효율을 향상시키기 위해 배란직전인 대리모를 선택하기 위해서는 질점액 점도 및 분비량, 외음부 발적 및 종창, 둔부 압박에 대한 반응 등 전형적인 외부 발정징후를 강하게 나타내는 대리모를 선택하여야 한다.

감사의 글

본 연구는 농림부 바이오장기생산 연구사업 및 2005학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원을 받아 수행되었습니다. 본 과제는 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 출연금 및 보조금으로 수행한 최우수실험실지원사업의 연구결과입니다.

참 고 문 헌

1. Baker RD, Coggins EG. Control of ovulation rate and fertilization in prepubertal gilts. *J Anim Sci* 1968; 27: 1607-1610.
2. Betthausen 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, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1055-1059.
3. Day BN, Longenecker DE, Jaffe SC, Gibson EW, Lasley JF. Fertility of swine following superovulation. *J Anim Sci* 1967; 26: 777-780.
4. Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 251-255.
5. Holker M, Petersen B, Hassel P, Kues WA, Lemme E, Lucas-Hahn A, Niemann H. Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning and Stem Cells* 2005; 7: 35-44.
6. Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, Jeong Y, Kim S, Yeom S, Kang S, Han J, Lee B, Hwang W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 2003; 69: 1060-1068.
7. 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, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089-1092.
8. Lee GS, Hyun SH, Kim HS, Kim DY, Lee SH, Lim JM, Lee ES, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology* 2003; 59: 1949-1957.
9. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289: 1188-1190.
10. Polejaeva IA, Campbell KH. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology* 2000; 53: 117-126.
11. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86-90.
12. Polge C, Rowson LE, Chang MC. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil* 1966; 12: 395-397.
13. Polge C. Control of pig reproduction. *Buttersworth, London*, 1981: 283-285.
14. Pope CE, Day BN. Transfer of preimplantation pig embryos following in vitro culture for 24 or 48 hours. *J Anim Sci* 1977; 44: 1036-1040.
15. Pope WF, Lawyer MS, Nara BS, First NL. Effect of asynchronous superinduction on embryo survival and range of blastocyst development in swine. *Biol Reprod* 1986; 35: 133-

- 137.
16. Ratky J, Brussow KP, Solti L, Torner H, Sarlos P. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a hungarian native pig breed, *Theriogenology* 2001; 56: 969-978.
 17. Robl JM, First NL. Manipulation of gametes and embryos in the pig. *J Reprod Fertil Suppl* 1985; 33: 101-114.
 18. Signoret JP. The mating behaviour of the sow. In; Cole, D.J.A. *Pig Production*. Butterworths: London, 1971: 295-313.
 19. Soede NM, Kemp B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52: 91-103.
 20. Webel SK, Peters JB, Anderson LL. Synchronous and asynchronous transfer of embryos in the pig. *J Anim Sci* 1970; 30: 565-568.
 21. Winfield CG. Oestrus detection in pigs. *Reviews in Rural Science* 1980; 4: 83-86.