

# 사람 H-Transferase 유전자 과발현 형질전환 체세포주 확립 및 검증

이상미 · 박효영 · 김혜민 · 문승주 · 강만중<sup>†</sup>

전남대학교 농업생명과학대학, 농업과학기술연구소, 동물자원학부

## Production and Characterization of Porcine Cell Lines Overexpressing Human H-Transferase

Sang Mi Lee, Hyo Young Park, Hey-Min Kim, Seung Ju Moon and Man-Jong Kang<sup>†</sup>

Department of Animal Science and Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

### ABSTRACT

This study was carried out to develop cell lines overexpressing human H-transferase (HT). One of the approaches to prevent hyperacute rejection in xenotransplantation might be the expression of human HT in porcine cells. In this study, we cloned human HT gene from HepG2 cells using RT-PCR to establish HT-overexpressing vector. The full-length cDNA of human HT was inserted into the 3' end of CMV promoter for construction of the overexpression vector pRc/CMV-hHT. Using jetPEI DNA transfection reagent, the vector was introduced into porcine ear skin fibroblasts from newborn piglets. Transfected cells were selected by treatment of 300 µg/ml G418 for 12 days. After antibiotic selection, survived colonies with approximately 5 mm in diameter were picked and analysed for transgene human HT by PCR. The colonies proven to be human HT transfectants were analysed by RT-PCR to determine their expressions of human HT. In all colonies tested, human HT mRNA was detected. This result demonstrates the establishment of porcine cell lines overexpressing human HT, and these cell lines may be used for the development of transgenic pigs for xenotransplantation.

(Key words : H-transferase, Xenotransplantation, Transgenic pigs)

### 요 약

본 연구는 사람 H-transferase가 과발현하는 돼지 체세포주를 개발하는데 있다. 돼지 세포에 사람 H-transferase 유전자를 발현시키는 것은 이종간 장기 이식에 있어서 초급성 거부 반응을 방지하기 위한 한 가지 방법이다. 본 연구에서는 과발현 벡터를 구축하기 위하여 사람 H-transferase을 HepG2 세포로부터 동정하였으며, 이 유전자를 CMV promoter를 이용하여 발현할 수 있도록 포유동물 발현 벡터인 pRc/CMV 벡터에 삽입하였다. 또한, 돼지 산자의 귀 세포를 이용하여 체세포를 수립한 후 jetPEI DNA transfection reagent를 이용하여 벡터를 도입하였고, 300 µg/ml의 G418로 12일간 선별하였다. PCR을 이용하여 선별된 colony들을 분석한 결과, 벡터가 도입되었음을 확인하였고, RT-PCR을 이용하여 사람 H-transferase mRNA가 발현하는 것을 확인하였다. 본 연구에서 확립된 세포주는 사람 H-transferase가 과발현하는 형질 전환 돼지의 생산에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 서 론

1981년 Brinster 등이 성장 호르몬 유전자를 인위적으로 mouse 수정란에 도입하여 거대 생쥐를 탄생시켰으며, 이것은 포유 동물에 외래 유전자를 도입한 최초의 결과이다. 이러한 연구를 시작으로 현재 생명공학의 발달은 유전자

조작된 동물의 생산에 의하여 고가 의약품의 생산, 질환 모델 동물의 생산, 장기 이식 동물의 생산 등 광범위하게 진행되고 있다. 이러한 연구들 중 장기 이식 동물의 생산은 질환으로 장기 이식을 기다리는 환자들에게는 매우 절실한 것이며, 2001년도 미국에서는 약 8만 명 이상의 환자가 장기 이식을 기다리고 있으나, 이 중 2만 4천명의 환자만 장기를 이식 받고 있는 실정이다. 이러한 문제는 절대적으로

\* 본 연구는 과학기술부 복제적용기반사업(M1042201000205N220100211) 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-62-530-2113, E-mail: mjkgang@chonnam.ac.kr

공급되는 장기의 부족에 의한 것으로서 이 문제를 해결하기 위한 방법으로 동물의 장기를 사람에게 이식하는 이종간 장기 이식이 대두되었다. 이종간 장기 이식 동물로는 장기의 크기가 사람과 비슷하고, 바이러스에 의한 감염률이 적기 때문에 주로 돼지가 이용되고 있다. 그러나 이러한 방법에 의하여 이식된 장기들은 사람의 체내에 존재하는 자연 항체에 의해 인식되어 초급성 거부 반응을 일으켜 이식된 장기를 괴사하게 만든다. 이와 같은 문제점을 해결할 방법으로 xenoreactive natural antibodies(XNA)가 인식하는 이식 장기의 epitopes를 제거한 동물을 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Platt와 Bach, 1991; Auchincloss와 Sachs, 1998; Weiss, 1998; Wang과 Zhou, 2003). 이러한 epitopes의 하나로  $\alpha$ 1,3-galactosyl(Gal) epitopes가 있으며, 이 epitopes는  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase 유전자에 의하여 돼지 세포의 표면에 형성된다(Fodor 등, 1994).

최근 생명공학의 발달은  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase 유전자의 발현이 제거된 동물의 탄생을 가능하게 하고 있으며, 그 방법은 gene targeting 법과 복제 동물 생산 방법의 응용이다. 이와 같은 방법에 의하여 미국 미주리 대학의 Lai 등은 2002년에 복제 방법에 의하여  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase 유전자가 knock-out 된 복제 돼지를 만들었다고 보고하였으며(Dai 등, 2002; Lai 등, 2002, Phelps 등, 2003; Kolber-Simonds 등, 2004, Ramsoondar 등, 2003), 또한 2003년에는 Ramsoondar 등도 human  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase(H-transferase) 유전자가 과발현되고 돼지의  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase 유전자가 knock-out된 돼지를 만들었다고 보고하였다(Ramsoondar 등 2003).

1998년 Chen 등은 사람 H-transferase가 발현하는 생쥐와 Gal knock-out 생쥐를 이용하여 이들 두 가지 유전자가 조작된 생쥐는 초급성 거부 반응을 완화시킬 수 있을 것이라는 보고를 하였다. Costa 등(1999)은 CMV promoter에 의하여 H-transferase가 과발현하는 돼지를 개발하였으며, 거부 반응에 관여하는 세포 표면 당쇄를 변형시켜 장기 이식용으로의 이용 가능성을 보고하였다. 또한, 2002년에는 Costa 등은 CD59와 HT가 공동 발현하는 돼지를 개발하였으며, 이들 돼지의 장기는 거부 반응이 완화됨을 보고하였다(Costa 등, 2002). 2005년에는 Ramirez 등에 의하여 CD-55, CD59, H-transferase가 동시에 발현하는 돼지의 간을 baboon 원숭이에 이식하여 초급성 거부 반응이 억제됨을 보고하였다(Ramirez 등, 2005).

이러한 기술에 의하여 탄생된 돼지는 앞으로 이종간 장기 이식에 사용될 가능성이 높고 장기 이식을 위한 동물의 생산 기술은 더욱 발전할 것으로 생각된다. 이와 같은 장기 이식용 복제 돼지의 생산은 XNA가 이식된 장기의 epitopes를 인식하여 발생하는 초급성 거부 반응을 방지하고자 관련 유전자의 제거 및 과발현한 돼지를 생산하는데 있다. 특히 H-transferase의 발현은  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase에 의하여 생성되는 Gal  $\alpha$ 1,3-Gal antigene 발현을 억제하여 초급성 거부 반응을 방지할 수 있을 것으로 보고하고 있다(Sandrin 등, 1995; Costa 등, 2002).

그러나 국내에서는 H-transferase가 과발현되는 형질 전환 체세포 및 돼지의 생산되었다는 보고가 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 초급성 거부 반응을 줄여 돼지의 보체 활성화를 억제시키기 위하여 H-transferase 유전자 과발현 벡터 및 과발현 세포를 개발하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### RT-PCR에 의한 사람 H-transferase cDNA의 동정

사람의 H-transferase cDNA는 사람의 hepatocellular carcinoma cell line인 HepG2 cell로부터 total RNA를 정제한 후 RT-PCR에 의하여 다음과 같이 동정하였다. Total RNA는 DNase I 효소(Takara, Japan)를 이용하여 genomic DNA를 제거하였다. 정제된 RNA 5  $\mu$ g을 이용하여 Superscript II RNaseH-reverse transcriptase (Invitrogen, USA)와 random primer를 이용하여 사용설명서에 따라 first strand cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 NCBI에 보고된 사람 H-transferase 유전자(GeneBank Accession No. M35531)에 상응하는 10 pmol sense(ATCTGCCACCTGCAAGCAGCTCGGCCATGT)와 antisense(GCTCTCAAGCCTTAGCCAAT GTCCAGATG) primer를 이용하여 1 $\times$  PCR buffer, 0.5 U i-star Taq-polymerase(Intron, Korea), 각 100  $\mu$ M dNTP 조성으로 94 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 68 $^{\circ}$ C에서 20초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 20초간 extension, 40 cycle의 반응조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 약 1.1 kb size의 band를 확인하였으며, 염기 서열 결정을 위하여 T-vector(Promega, USA)에 subcloning 하였다. 염기 서열 결정은 ABI PRISM 377 sequencer(Applied Biosystems)를 사용하여 결정하였다. 결정된 염기 서열 분석은 Genetix-win (version 4.0)을 이용하여 분석하였다. 본 PCR 조건은 H-transferase 유전자가 도입된 세포의 확인 및 H-transferase RNA의 발현 확인에도 동일하게 사용하였다.

### pRc/CMV-hHT 발현 벡터의 구축

H-transferase 유전자 과발현 vector의 구축은 mammalian expression vector인 pRc/CMV vector에 사람 H-transferase 유전자를 ligation하여 다음과 같이 구축하였다. 먼저 pRc/CMV vector multicloning site에 있는 Not I site를 제한효소를 이용하여 절단하고 T-vector에 cloning되어 있는 사람 H-transferase cDNA 1128 bp를 제한 효소 Not I로 절단한 후 pRc/CMV/Not I vector에 ligation하였고, competent cell DH5  $\alpha$ 에 transformation한 다음 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 H-transferase cDNA가 삽입되었는지 염기배열 결정에 의하여 확인하였으며, 확립된 벡터는 돼지 귀 체세포 도입에 이용하였다.

### 돼지 귀 체세포에 pRc/CMV-hHT 발현 벡터의 도입과 선별

돼지 귀 체세포에 pRc/CMV-hHT 발현 벡터의 도입은 jetPEI DNA transfection reagent (Polyplus Transfection, USA) kit을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 Transfection을 하기 위하여 돼지 귀 세포를 3-cm dish에 15% FBS(Hyclone, USA)이 포함된 DMEM(Gibco BRL Co., USA)을 이용하여  $1.5 \sim 1.8 \times 10^5$  cell을 접종한 다음 16 시간 동안 배양하였다. DNA liposome complex는 6  $\mu$ g DNA를 포함하는 150 mM NaCl 100  $\mu$ l와 jetPEI 8  $\mu$ l를 포함하는 150 mM NaCl 100  $\mu$ l를 혼합한 후 vortexing을 10초간 실시한 다음 complex가 구성되도록 실온에 30분 방치하였다. 배양중인 세포는 1회 세포배양액을 세척한 후 1.8 ml의 새로운 배지로 교환하였으며, 여기에 DNA liposome complex 200  $\mu$ l을 첨가하여 세포에 독성이 없으면

24시간 후 세포 배양 배지를 교환하였다.

pRc/CMV-hHT vector가 transfection 된 세포는 G418 300 µg/ml에서 12일 동안 배양하여 선별하였다. 형성된 colony는 cloning cylinder(Sigma, USA)를 이용하여 분리하고 pick up하였다. cylinder에서 confluent하게 자란 세포는 24-well dish, 12-well dish, 6-cm dish, 10-mm dish 순서로 계대 배양을 한 후 cell을 회수하고 genomic DNA와 RNA를 정제하여 사람의 H-transferase가 발현하는 세포를 확인하였으며, 또한 동결 보존하였다.

### 결 과

#### H-transferase 유전자의 클로닝과 구조 해석

사람 H-transferase cDNA을 동정하기 위하여 PCR를 수행한 결과, 1,128 bp의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 1A). 또한, 염기 배열을 결정하고 NCBI에 보고되어 있는 H-transferase cDNA의 coding 영역과 nucleotide에서 99.6%의 상동성(미제시)을 나타내었으며, 아미노산에서도 98.9%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1B).

#### 사람 H-transferase 과발현 벡터의 구축

동정된 사람 H-transferase cDNA을 이용하여 Fig. 2에 나타난 바와 같이 pRc/CMV promoter에 의하여 발현될 수 있는 벡터를 구축하였다(Fig. 2).

#### H-transferase 유전자 과발현용 벡터의 체세포 내 도입 및 선별

pRc/CMV-H transferase 과발현 벡터를 돼지 귀 체세포에 도입한 다음 G418 선별 12일 째에 전체 42개의 colony를 pick up할 수 있었다. 선별된 colony에서 H-transferase

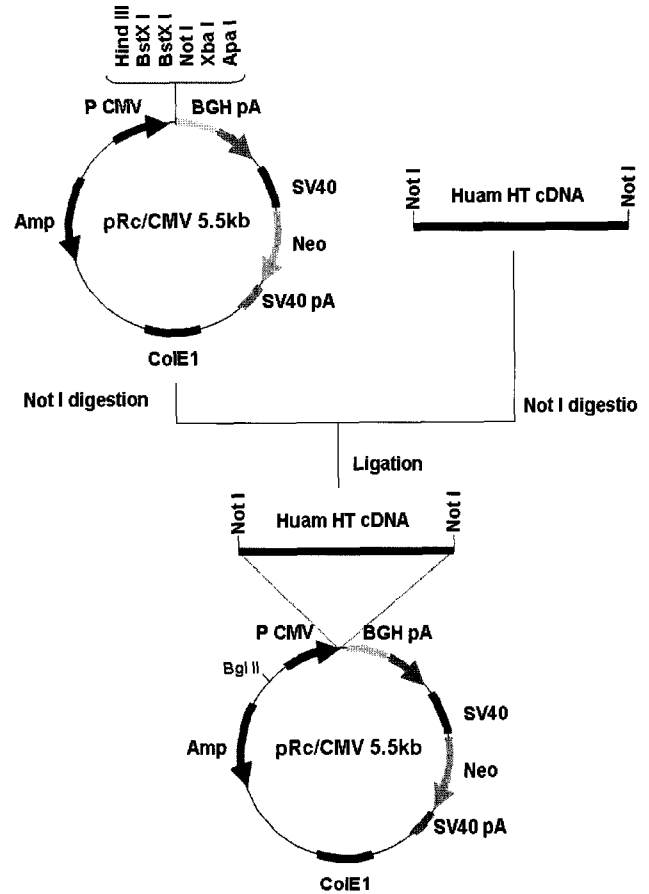


Fig. 2. Construction of human H-transferase expression vector. The full-length cDNA of human H-transferase was inserted into Not I site at 3' end of CMV promoter in pRc/CMV expression vector.

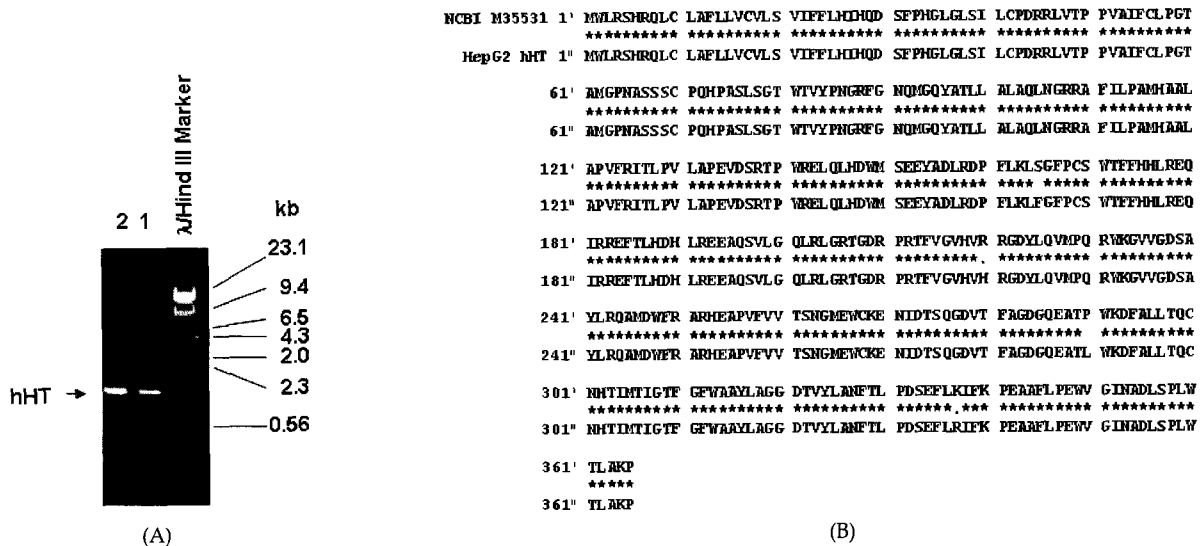


Fig. 1. PCR amplification of H-transferase (A) and the deduced amino acid sequence of H-transferase cloned from HepG2 cell (B). Total RNA from HepG2 cell was isolated using TRI-zol Reagent. Synthesis of first strand cDNA was performed using Superscript II Rnase H- reverse transcriptase with random primer and 5 µg of total RNA as template. PCR was conducted with specific primer for human H-transferase and i-star Taq-polymerase. The amino acid sequence was compared GenBank Accession No. M35531.

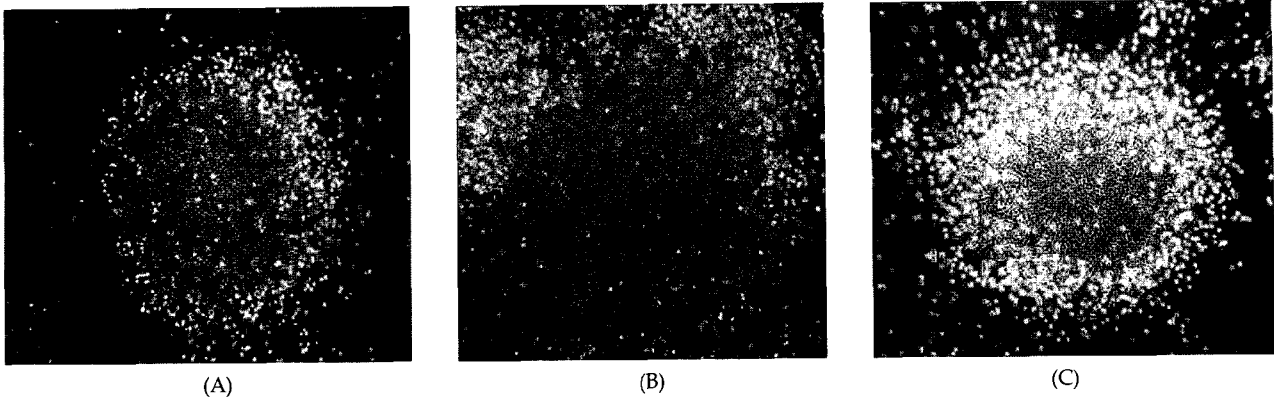


Fig. 3. Colony formation after G418 selection. The pRC/CMV-HT expression vector was transfected into porcine ear fibroblast cells, and the cells were selected with G418 300  $\mu$ g/ml for 12 days. The colonies of approximately 5 mm in their diameter were picked and analysed for H-transferase. Colony A, B, C (original magnification 40 $\times$ ) was selected in the different dish.

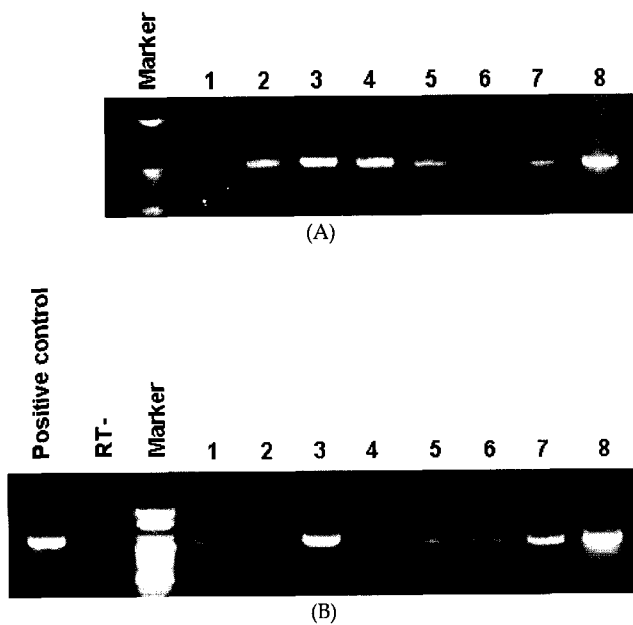


Fig. 4. The integration (A) and expression (B) of human H-transferase gene in porcine ear fibroblast cells. After colony formation, cells were passaged at confluence in 90-mm dishes. The genomic DNA and total RNA were extracted from transfected cells. PCR and RT-PCR were performed with 100 ng genomic DNA and 5  $\mu$ g total RNA. PCR was carry out with specific primer for human H-transferase. To avoid false PCR signals from the contamination of genomic DNA, a control sample (RT-) that the reverse transcriptase was omitted from the step of cDNA synthesis were run in parallel.

유전자 과발현 용 벡터가 도입되었는지 확인하고자 genomic DNA를 이용하여 PCR을 실시한 결과, Fig. 4A에 나타난 바와 같이 분석한 8개의 colony 모두에서 사람 H-transferase 특이적 band를 검출할 수 있었다. 또한, 사람 H-transferase mRNA의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, Fig. 4B에서 나타난 바와 같이 8개 모두에서 그 유전자의 발현이 확인되었다.

## 고 찰

최근 이종간 장기 이식에 있어서 초급성 거부 반응을 방지하기 위하여 장기 이식용 복제 돼지를 생산하고자 하는 연구가 시도되고 있다(Costa 등, 2002; Ramsoondar 등, 2003). 본 연구에서는 Gal  $\alpha$ 1,3-Gal antigene 발현을 억제하여 초급성 거부 반응을 방지할 수 있을 것으로 보고되고 있는 사람 H-transferase 유전자 과발현 돼지 체세포를 확립하였다. 본 연구에서 HepG2 세포로부터 동정된 사람 H-transferase 유전자는 기존에 NCBI에 보고된 사람 H-transferase(GenBank Acession No. M35531)와 높은 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 동정된 유전자가 사람 H-transferase 유전자임을 나타내는 것이다. 이 유전자를 이용하여 사람 H-transferase 유전자를 과발현 벡터 구축하였다. 과발현 벡터는 pRC/CMV promoter에 의하여 발현될 수 있도록 H-transferase 유전자를 연결하였으며, 이들 벡터를 돼지 귀 체세포에 도입하였다. CMV promoter는 보편적으로 다양한 세포에서 발현이 가능한 것으로 알려져 있으며, Costa 등(1999)은 CMV promoter에 의하여 사람 H-transferase가 과발현 되는 형질 전환 돼지를 생산하고, 신장, 간, 폐, 심장, 등 여러 장기에서 그 발현을 확인한 결과, 거의 모든 장기에서 발현됨을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 promoter도 다양한 장기에서 발현할 수 있을 것으로 생각된다.

또한, 본 연구에서는 돼지 귀 체세포에 벡터를 도입하고 G418 선별 12째에 colony를 pick up 할 수 있었다. 그러나 Kuhholzer 등(2000)은 돼지 태아 섬유아 세포에 aminoglycoside phosphotransferase 유전자를 도입하고 400  $\mu$ g/ml G418로 13일간 처리하여 유전자가 도입된 세포를 선별하였다고 보고하고 있다. 그리고 Lai 등(2002)도 alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs를 생산하기 위하여 돼지 태아 섬유아 세포에 벡터를 도입하고 G418 선별 후 14 일째에 세포를 계대 배양한 것으로 보고하고 있다. 이와 같은 결과는 배양액 조성의 차이 또는 실험에 이용된 세포의 차이일 것으로 추측된다.

일반적으로 과발현 벡터는 random하게 염색체 내에 삽입이 되며, 안정적으로 삽입된 세포는 세포 선별에서 생존

하게 된다. 본 연구에서도 유전자 도입 후 선별한 8개 세포에서 모두 H-transferase 유전자를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 유전자 도입과 선별이 매우 효과적임을 나타낸다. 그리고 분석한 8개의 colony 모두에서 mRNA가 발현되었다. 또한, negative control인 RT-에서는 전혀 band가 검출되지 않아 사람 H-transferase 유전자를 증폭하는데 있어 RT-PCR의 특이성이 있는 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용한 CMV promoter에 의하여 사람 H-transferase 유전자 돼지 귀 체세포에서 효과적으로 발현하고 있음을 나타내고 있다.

따라서 본 연구에서 사람 H-transferase의 발현이 확인된 세포는 장기 이식용 복제돼지 생산에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 인용문헌

1. Auchincloss H, Sachs DH (1998): Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 16:433-470.
2. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senechal AW, Warren R, Palmiter RD (1981): Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27:223-231.
3. Chen CG, Salvaris EJ, Romanella M, Aminian A, Katerelos M, Fisicaro N, d'Apice AJ, Pearse MJ (1998): Transgenic expression of human alpha 1,2-fucosyltransferase (H-transferase) prolongs mouse heart survival in an *ex vivo* model of xenograft rejection. *Transplantation* 65:832-837.
4. Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Ditullio PA, Ebert KM, Fodor WL (1999): Expression of the human alpha 1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J* 13:1762-1773.
5. Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Dalmaso AP, Fodor WL (2002): Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* 9:45-57.
6. 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 (2002): Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20:251-255.
7. Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W, Squinto SP (1994): Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11153-11157.
8. Kuhholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day BN, Prather RS (2000): Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 56:145-148.
9. Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Bettthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ (2004): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7335-7340.
10. 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 (2002): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
11. Platt JL, Bach FH (1991): Discordant xenografting: challenges and controversies. *Curr Opin Immunol* 3: 735-739.
12. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2002): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
13. Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod* 69:437-445.
14. Ramirez P, Montoya MJ, Rios A, Garcia Palenciano C, Majado M, Chavez R, Munoz A, Fernandez OM, Sanchez A, Segura B, Sansano T, Acosta F, Robles R, Sanchez F, Fuente T, Cascales P, Gonzalez F, Ruiz D, Martinez L, Pons JA, Rodriguez JJ, Yelamos J, Cowan P, d'Apice A, Parrilla P (2005): Prevention of hyper acute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase). *Transplant Proc* 37:4103-4106.
15. Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohnen S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF (1995): Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytolysis. *Nat Med* 1:1261-1267.
16. Weiss RA (1998): Xenotransplantation. *BMJ* 317:931-934.
17. Wang B, Zhou J (2003): Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol* 1:103.

(접수일자 2007. 8.12 / 채택일자 2007. 9. 13)