

복제한우 폐조직에서 특이 유전자 발현에 관한 연구

김상환¹ · 정덕원¹ · 이호준² · 황수연¹ · 민관식¹ · 윤종택^{1,3,*}

¹한경대학교 생물환경정보통신 전문대학원 동물생명공학 전공, ²유전공학연구소, ³동물생명환경과학부

Studies on the Specific Gene Expression in Lung Tissue of the Cloned Hanwoo

Sang-Hwan Kim¹, Duck-Won Chung¹, Ho-Jun Lee², Sue-Yun Hwang¹, Kwan-Sik Min¹ and Jong-Taek Yoon^{1,3,*}

¹Major in the Animal Biotechnology, GSBIT, ²Institute of Genetic Engineering,

³Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the specific expression genes in the cloned bovine tissues. Donor cells, cloned tissues were analysed by RAPD-RFLP method. The results were detected three genes (CH-U7B, CH-U7M and CH-U7P) in the cloned fetus. It was found a single copy genes by southern hybridization. Sequence analysis of CH-U7M gene was shown 99% homology to a previously reported EST from a cloned bovine fetus. The putative ORF was encode a protein of hydrophobicity index 0.03. Semi-quantitative RT-PCR by using the CH-LS001 specific primer was remarkably detected in the lung tissue of cloned fetus. Further investigation of these genes may provide one of the key information to explain the early death, abnormal fetus, large off-spring and the low pregnancy rate in the production of cloned bovine.

(Key words : Cloned Hanwoo, Specific gene expression, Lung)

서 론

Wilmut(1987) 등이 5세된 양의 유선상피세포를 이용하여 Dolly를 생산한 이래 생쥐의 난구세포(WaKayama 등, 1998), 꼬리세포(WaKayama 등, 1998), 소의 난구세포와 자궁상피세포(Kato 등, 1998, 2000), 태아섬유아세포(Cibelli 등, 1998; Nguyen 등, 2000; Wells 등, 1998)를 이용한 체세포 복제동물의 생산이 보고되었다. 이러한 복제동물의 생산은 생물학과 의학적인 연구 및 형질전환동물 생산에 이르기까지 무한한 발전 가능성을 제시하였으며, 현재까지 소를 비롯한 가축과 여러 실험동물에서 체세포복제동물이 생산되었다(Dominko 등, 1999; Wakayama 등, 1998; Gary 등, 1996). 또한, 유용 유전자를 이용한 형질전환동물이 생산되어 인간에게 유용한 단백질의 대량 생산(Clark 등, 2001), 유성분의 변형(Wilmut 등, 1997)등 많은 연구가 이루어지고 있다.

그러나 체세포를 이용한 복제동물이 난산, 호흡기장애 및 호흡곤란 등에 의하여 폐사되는 것과 관련하여 유전적 변이현상이 일어날 수 있다는 것이 시사되고 있다(Suzuki 등, 2000). 따라서 많은 연구자들은 유전자 발현에 초점을 맞추어 mtDNA의 유전적 변이(정 등, 1996), 체세포의 reprogramming, methylation 양상(Ratnam 등, 2002) 및 염기

서열상의 결함 등에 관한 연구가 보고되고 있는 현실이다(Shijie 등, 2004). 복제 송아지의 돌연사에 대한 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 X-chromosome의 inactivation에 관련된 유전자를 연구하였고, Penny(1996) 등은 생체발육에 관련한 BMP4 유전자의 mRNA의 발현 양상을 심장, 간, 폐, 신장 등의 조직에서 분석한 결과, 핵이식 세포의 노화에 따른 유전자 발현이 다르게 나타나고 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 중간별 및 발현 이상 유전자를 탐색할 수 있는 분자생물학적 기법(Moore 등, 1992; Hooft 등, 1999; Michael 등, 1990; Williams 등, 1990; 강 등, 1998; 강 등, 2000)을 활용하여 복제 송아지의 폐사 원인으로 나타나는 폐 기능 이상을 분자 수준에서 검토하기 위하여, 기관 특이적으로 발현되는 유전자를 분석하였다.

재료 및 방법

공시재료

복제 송아지 특이 유전자 분석을 위한 시료

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호: 20080401034074) 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-5094, E-mail: jtyoon@hkn.u.ac.kr

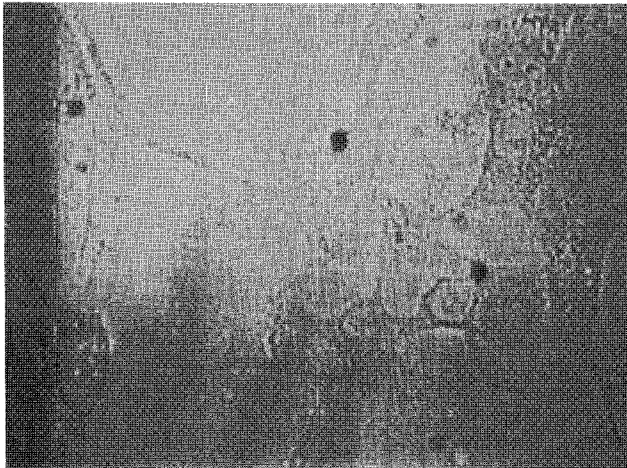
공시 시료로서는 한경대학교에서 2003년에 탄생한 한우 숫소 복제 송아지인 한경 100호의 폐 조직을 사용했다. 대조구로는 복제송아지 한경 100호와 일령이 같은 수송아지 및 임신 9개월경의 한우 암송아지의 폐조직, 그리고 *microsatellite*로 분석된 복제 송아지의 공여세포를 공시하였다. 복제 송아지의 공여세포는 10% DMEM(Sigma, USA.)의 혈청 배지에서 일주일간 배양하여 *trypsin* 처리를 통해 Cell을 회수하였다(Fig. 1).

특이적 유전자의 발현을 위한 분석시료

분석이 완료된 후 복제송아지에게만 나타난 특이적인 유전자의 발현량과 발현 상태를 측정하기 위해 한경 복제 송아지의 폐조직과 정상 수송아지의 폐 조직, 정상 암송아지의 폐 조직 그리고 복제송아지와 같은 공여세포로 만든 핵이식 수정란 및 체외수정란을 공시하였다.

병리분석

체세포 복제 송아지인 한경 100호가 폐사된 후 국립수의과학검역원에 부검 의뢰하여 진단 소견에 따랐다. 이때



(A) Donor cell



(B) Cloned Hanwoo

Fig. 1. The donor cell (left) and lung of Cloned Hanwoo calf (right).

의 부검은 각 장기별의 바이러스 관련 질병 검사와 조직 이상 관련 검사를 함께 의뢰했다.

RNA Extraction 및 cDNA 합성

공시된 조직과 세포에서 total RNA 추출은 Easy-Blue kit(Intron, Kor.)를 이용하여 chloroform(vol/vol)으로 침전시켜 추출하고 75% 에탄올(100% EtOH 35 ml + DEPC 15 ml) 1 ml를 이용하여 세정시킨 후 1% DEPC-treated water에 RNase inhibitor 1 μ l를 섞어 함께 녹여 -80°C 이상의 냉동고에 70% EtOH-DEPC를 상층하여 보관하였다. 공여세포의 경우에는 5×10^5 의 total cell을 이용하여 추출을 하였다. 각 추출된 total RNA는 smart spec 3000(Biorad, Ltd.)분석을 통해 A260/A280이 1.8~1.9가 되는 것을 이용하였으며, mRNA의 유전자를 분석하기 위하여 Oligo(dT) primer를 사용하여 reverse transcriptase로 cDNA를 합성하였다.

RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNA) Analysis

RAPD-PCR 분석은 URP-Primer 및 random primer를 이용하여 분석하였다. Random-primer는 120종을 사용하여 polymorphism 1차 PCR 분석 후 다시 선택하고 band 간의 구별이 용이한 20종의 primer를 재 선택하여 분석을 실시하였고, 처음 94°C 에서 5분 반응시킨 뒤 94°C 에서 30초, 55°C 에서 30초, 72°C 에서 40초를 총 35회 반복하여 증폭하였으며, 마지막으로 72°C 에서 8분 동안 말단을 합성하였다. PCR 후 3% agarose gel에서 100V로 3시간 동안 전기 영동하여 polymorphism을 확인하였다.

RAPD-RFLP Analysis

RFLP를 하기 위하여 BamHI, Pst I, Msp I의 enzyme를 사용하여 RAPD 산물 1 μ g/ μ l당 5unit로 37°C 에서 각각 3시간 동안 제한효소로 처리한 후 4°C 에서 정지시켰고, 3% LA agarose gel(Gellix, Kor.)에서 100V로 약 4시간 동안 전기영동을 실시하여 polymorphism의 분석도를 확인하였다.

10% Native Polyacrylamide Gel Analysis

RFLP의 단편들의 다형성의 세분화된 fragments를 8 bp 이하의 차이까지 확인하기 위하여 10% native polyacrylamide gel을 사용하여 분석하였다. Sample은 10 μ l당 0.5 volume으로 electrophoresis 6X loading dye을 섞어 얼음 위에서 5분 동안 안정화 시켜 loading한 후 200V에서 약 4시간 정도 전기 영동하여 각각의 polymorphism을 silver staining으로 분석하였다.

Gene Cloning

복제 송아지의 폐 조직을 RAPD로 분석한 다음 polymorphism의 단편을 전부 elution하고, elution sample을 enzyme으로 재처리한 후 Target gene을 확인하여 단편을 cloning 하였다. Cloning 방법은 먼저 PCR-Product 2 μ l에 2xligase buffer 5 μ l, T4 DNA ligase 2 μ l, T-Vector 1 μ l를 혼합하여 4°C 에서 24시간 DNA ligation을 하였고, 이후 ligation 산물 10 μ l와 competent cell 100 μ l(DH5 a

Toyobo, Jap.)을 혼합하여 20분 동안 얼음에 냉각하여 안정화시킨 후 42°C에서 1분 30초간 vector transfer를 유도한 후 SOC 100 μ l에 섞어 37°C에서 1시간 30분 동안 1차 배양을 실시하였다. 이후 X-gal LB plate에 접종하여 37°C에서 약 17시간 배양하였으며 X-gal의 반응에 따라 insert가 완료되어 white colony로 형성한 것만을 선택하여 미리 만들어둔 LB-Broth ampicillin에 다시 접종하여 37°C에서 약 17 시간 동안 배양하였다.

Southern Blot Hybridization

복제항우에서 RAPD 분석 방법을 이용하여 특이적 발현이 나타난 단편을 probe로 제작하여 조직과 세포로부터 RNA 분리 후 cDNA를 합성하여 전기영동 후 southern blot hybridization을 수행하였다. 각 sample은 1.5% gel에서 100V로 4시간 전기영동을 실시하였고, gel transfer는 vacuum transfer(Toyobo, Jap.)를 이용하여 1시간 30분 동안 nylon membrane(Amersham, USA)에 산물을 흡착시키고 2 \times SSC 완충액으로 세척한 후 120°C dry oven에서 30분간 건조시킨 다음 probe를 표지하여 hybridization을 수행하였다.

Probe DNA는 DIG DNA labeling kit (Roche, USA)를 사용하여 DIG-11-dUTP로 표지하고, hybridization에 사용하였다. DNA 표지 방법은 probe DNA(25ng)를 100°C에서 약 10분간 끓여 변성시켜 실온에서 식히고 Mix DIG-High primer-용액인 Hexanucleotide 2 μ l와 [DIG-11-dUTP]dNTP 2 μ l, Klenow 1 μ l의 용액을 섞어 microcentrifuge tube에 넣어 37°C에서 24시간 동안 반응을 유도하였다. 이후 Probe의 반응 종료는 0.2M EDTA 2 μ l를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. Probe DNA를 hybridization할 때는 100°C에서 10분간 변성시킨 후 얼음에서 3분간 냉각시켜 반응을 정지시킨 후 사용하였다. Detection은 NBT/BCIP detection(Roche, USA)을 이용하여 발색 및 현상하였다.

Sequence Analysis

Plasmid DNA의 추출은 cloning된 형질전환 대장균에서 PLASMID Kit(Toyobo, Osaka)를 이용하여 추출하였다. 추출된 10 μ l 이상의 plasmid-product에 EcoR I 10U/ μ l로 37°C에서 2시간 제한효소로 처리하여 insert 되어진 유전자의 위치를 확인한 다음 plasmid DNA에 5 \times Buffer와 BIG-Dye(3.1V) 그리고 T7 primer를 첨가하여 denaturation은 96°C에서 10초간, annealing은 50°C에서 5초간, extension은 60°C에서 4분으로 35 cycle를 Big-dye solution(Takara, Jap.)으로 증폭하였다. 이후 DNA 정제를 위하여 isopropanol에 big-dye product를 섞어 실온에서 약 15분간 정치한 다음 상층액을 제거하고 70% EtOH로 침전시킨 후 100% formamide를 첨가하여 96°C에서 약 3분간 denaturation하여 정제를 하였으며, product는 capillary 방식의 3730XL sequencer(ABI, USA)로 분석하여 sequencer II program을 이용하여 각각의 염기서열을 분석하였다.

BLAST Search

염기서열이 분석된 target fragment의 sequence에서 해당 enzyme site를 찾은 후 그 크기를 확인하였고, total fragments의 sequence와 database상의 알려진 유전자들과

의 homology를 BLAST program을 이용하여 검사를 했다. BLAST 검사는 nr(non-redundant) pool에서 1차 검사를 하였고, 소의 cDNA 상에 sequence의 관계를 확인하기 위해 site sequence의 검증을 cow ESTs에서 검증했다. 이후 특이적 유전자의 sequence를 재분석하여 상동성이 가장 많은 결과를 사용하였다.

특이적 유전자의 Specific Primer의 합성 및 아미노산의 분석

Marker로서의 활용도를 알아보기 위하여 검사된 sequence에서 3 characters, 3 frame를 기준으로 AnnHyb (Bioinformatics, tm, USA.) 프로그램을 이용하여 amino acid를 조합하고, revers sequence를 이용하여 다시 3 characters, 3 frame으로 조합하여 full length로 사용할 수 있는지와 ORF의 identity를 검사하였다. 그리고 target sequence를 토대로 전체 구간의 시작 부위와 끝 부위를 1차 primer로 선택하였고, enzyme site를 이용하여 얻어진 특이적 유전자의 sequence를 토대로 2차 primer를 조합한 후 primer를 Bioneer를 통해 제작 의뢰하였다.

Semiquantitative RT-PCR

각 cDNA로 합성된 시료를 이용하여 bovine GAPDH primer를 사용하여 PCR를 실시한 후, cDNA의 합성 여부 및 합성효율을 확인하였으며, RT-PCR을 수행하기 위하여 한 가닥 cDNA량을 normalize 하였다. 동일량의 cDNA와 target primer를 사용하여 PCR한 후 agarose gel 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였다. 각각의 산물에 대한 band의 intensity를 densitometer (Vilber Lourmat, France.)를 이용하여 정량하고 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구의 주요 목적은 태아섬유아세포로 생산된 복제항우에서 발생하는 폐 질환 문제를 정상 소와 비교 분석함으로써 복제항우에서만 특이적으로 발현되는 유전자를 분석하여 복제항우의 특이적인 marker로 활용하고자 한다. 복제항우정란 유래 송아지 중 분만 직후 폐사한 송아지의 일반적 혈액성분은 Table 1과 같이 나타났으며, 분만 직후 생존한 송아지의 일반적 혈액성분은 WBC 39.0%, RBC 8.74%, HB 13.0%, HCT 45.0%, MCV 35.0%, MCH 10.0%, MCHC 24.0%이었다. 복제 송아지가 폐사하였을 때 장기 기관에 대한 바이러스성 및 항생제에 따른 가검물 검사 결과는 Table 2와 같다. 병리학적 소견으로 소 합포성 폐렴 (Bovine Respiratory Syncytial Virus : BRSV)과 아카노박테리아 폐렴(Arcanobacterial pneumonia)이 진단되어 직접적인 폐사의 사인은 호흡기질환으로 판명되었다. 폐사된 복제항우지는 기관지성 폐렴이 뚜렷했으며 기관지상의 합포체 형성과정도 진행되고 있었다.

그러나 복제항우 폐 조직에 나타난 경화소에 대한 소견은 기관지 간질성 폐렴으로 인한 경화소만으로 보기에 어려운 점이 많았다. 이 이유는 폐 조직의 경화소로 인한 백화 현상은 일반적으로 폐의 일부 엽에서만 나타나는 것이 일반적이거나, 복제항우 한경 100호의 경우 폐의 대엽 심엽 및 침엽 등 전체 폐 조직에서 나타나 있는 것을 확

Table 1. Blood compositions of calves produced from IVF and NT

		WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC
IVF	live	52	9	11	41	45	27	27
Clone calf	dead	16.24	6.62	8.08	30.58	43.6	12.3	28.26
Clone calf	live	39	8.74	13	45	35	10	24

Table 2. The pathological examination against the virus

Sample	Examination							Note
	IBR	BVD	Akabane	Aino	Chuzan	Neospora	Brucella	
CHM	-	-	-	-	-	+	-	

* CHM : Cloned Hanwoo Male.

인할 수 있었기 때문에 단순 병리학적인 문제점에서 벗어나 유전적인 문제로 접근하기로 하였다. 복제 송아지의 특이적인 발현 유전자의 형태를 찾기 위하여 정상수송아지(NHM), 정상암송아지(NHF), 복제송아지(CHM)에서 성별 및 조직과 세포간의 fragments에서 다양성을 볼 수 있었고, 대조군에 비해 복제송아지에서 유전자의 pattern이 많이 관찰되었다. 공여세포와 복제송아지간의 차이점을 나타내는 RAPD 산물 전체를 이용하여 RFLP 분석을 한 결과 개체간의 뚜렷한 차이를 나타내는 fragment를 관찰할 수 있었으며, 이에 따라 얻어진 산물을 BamH I로 digest 한 genomic DNA에서 약 8.05 kb의 유전자를 분석할 수 있었고, Msp I digest로는 약 5.80 kb, Pst I 는 약 6.40 kb의 길이를 분석할 수 있었다. 각 fragment의 분포는 10~16개 내외이었고, band의 site는 1.5 kb~500 bp까지의 분포도를 나타내었고, 이를 통해 10% Native polyacrylamide gel을 사용하여 RAPD-RFLP로 분석한 결과 복제송아지에게만 나타나는 특이적인 band를 회수할 수 있었다(Fig. 2).

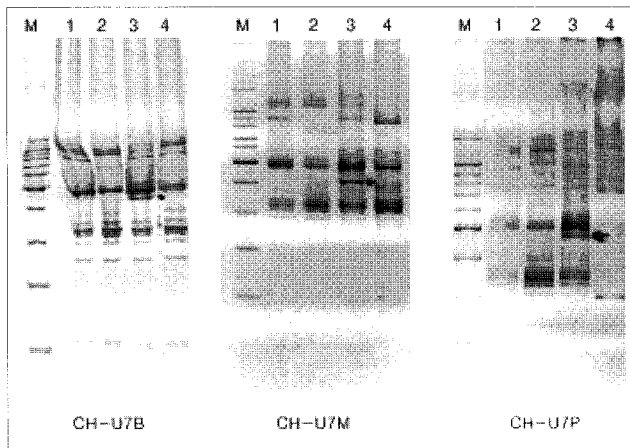


Fig. 2. RAPD-RFLP analyze in 10% Native Polyacrylamide.

(M lane, 100 bp marker ; 1 line, ♂ (NHM : Normal Hanwoo Male) ; 2 line, ♀ (NHF : Normal Hanwoo Female); 3 line, cloned Hanwoo (CHM : Cloned Hanwoo Male); 4 line, Donor cell (CHDC : Donor cell of Cloned Hanwoo).

복제송아지에서만 특이적으로 나타난 430 bp 크기의 CH-U7B와 370 bp 정도의 CH-U7M 그리고 410 bp 정도의 CH-U7P의 단편을 probe로 사용하여 copy 수 및 대략적인 위치를 알기 위하여 southern hybridization을 실시한 결과는 Fig. 3과 같았으며, 검출 probe는 단일위치에서 one band로 detect되는 것을 보아 분석된 유전자가 복제송아지의 genome상에서 single copy로 존재함을 알 수 있었다.

이를 통하여 확인된 유전자의 sequence를 Cow ESTs database에서 검사한 결과, 106~489 bp가 유전자의 일부 Cloned bovine fetus cDNA *Bos taurus* cDNA clone fetus28E08로 보고된 서열과 98%의 identity를 나타내고 있었으며, 16 bp~98 bp ORCS bovine utero-placenta cDNA *Bos taurus* cDNA clone ORCS13968 으로 보고된 서열과 94%의 identity를 나타내고 있었다. 이 두 EST clone

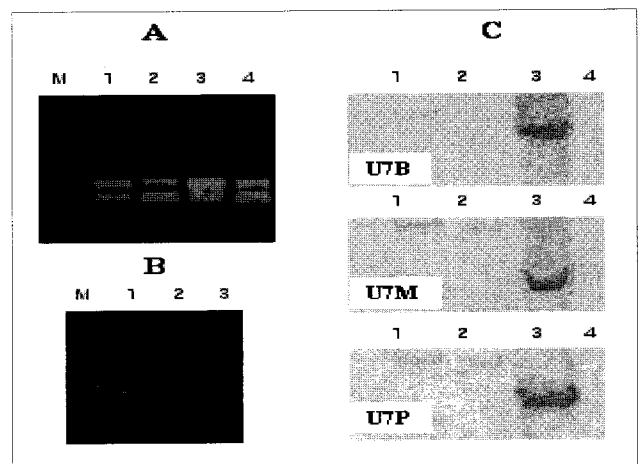


Fig. 3. Analysis of Southern hybridization. A, Electrophoresis of PCR product on 1% agarose gel(M line, 100 bp mark ; 1 line, ♂ (NHM : Normal Hanwoo Male) ; 2 line, ♀ (NHF : Normal Hanwoo Female); 3 line, cloned Hanwoo (CHM : Cloned Hanwoo Male); 4 line, Donor cell (CHDC : Donor cell of Cloned Hanwoo). B, Electrophoresis of probe(M line, 100 bp mark ; 1 line, U7B Prober ; 2 line, U7M Prober; 3 line, U7P Prober). C, Southern hybridization (1 line, ♂ (NHM : Normal Hanwoo Male) ; 2 line, ♀ (NHF : Normal Hanwoo Female); 3 line, cloned Hanwoo (CHM : Cloned Hanwoo Male); 4 line, Donor cell (CHDC : Donor cell of Cloned Hanwoo).

은 모두 unknown gene으로, 현재 이들 유전자의 기능을 알 수 없었으나 향후 그 기능 연구를 추진할 계획이다.

본 결과가 어떠한 amino acid의 형태를 띠고 있는지에 대한 분석을 위하여 3 characters, 3 frame으로 조합하여 분석한 결과 1 frame과 3 frame에서는 개시코돈이 존재하지 않았고, 앞부분에 종료 코돈이 자리 잡고 있었으며, 연속적으로 종료 코돈이 나타났다. 그에 비해 2 frame으로 조합한 결과에서는 시작 코돈과 약 200 bp 이상에서 종료 코돈이 확인되었으며, 하나의 amino acid sequence 서열로 위치하고 있었다. CH-SGTS의 5'쪽에 112 염기로 구성된 non-coding region이 있었고, 113번째 염기의 개시코돈인 ATG로부터 358번째의 종결 코돈인 TGA까지 234 bp의 염기로 이루어진 하나의 ORF(open reading frame)를 추정할 수

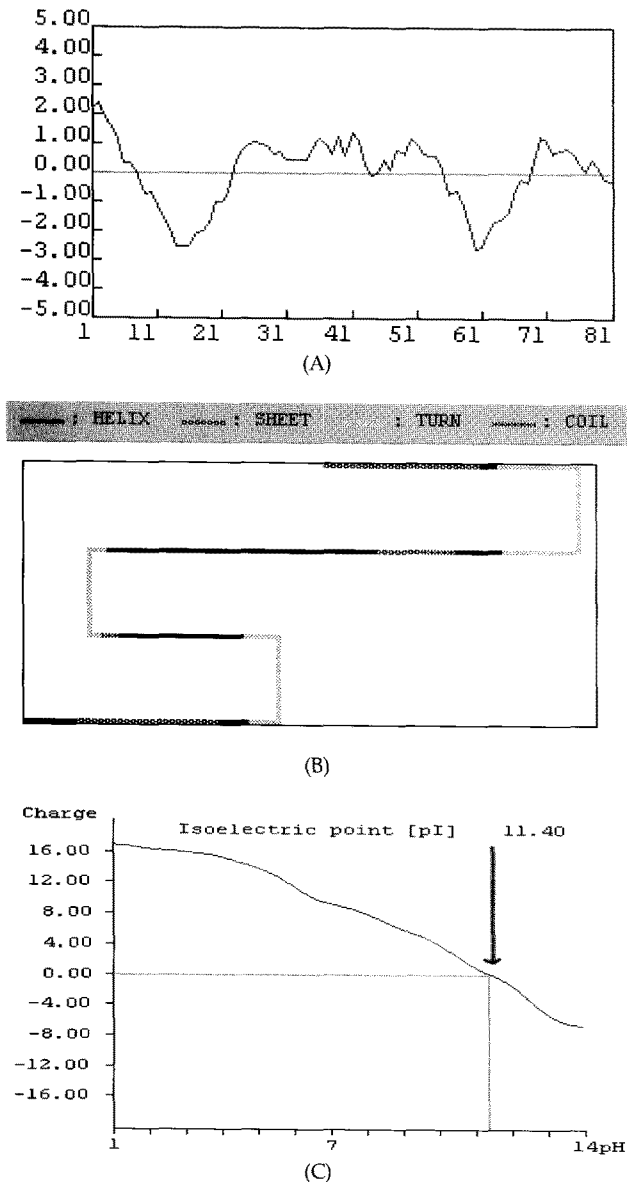


Fig. 4. Hydrophathic profile and protein 2D structure in CH-SGTS. A, Hydrophathic profile. B, 2D structure. C, Isoelectric point calculated from deduced amino acid sequence.

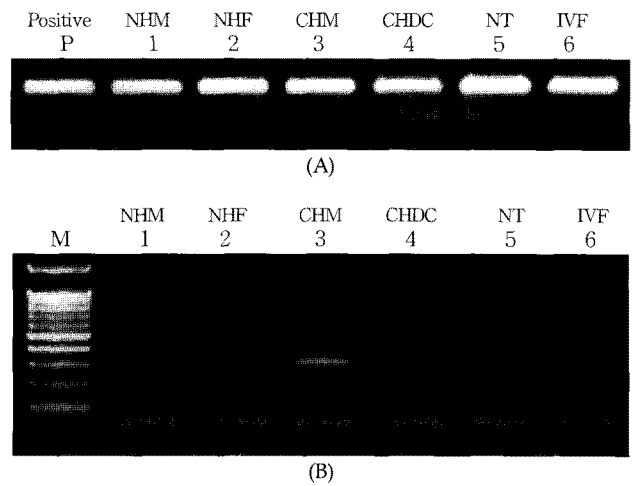


Fig. 5. Estimation of CH-LS001 gene expression using semi-quantitative RT-PCR. A, The GAPDH RT-PCR products from Positive control, NHM, NHF, CHM, Donor cell, NT and IVF. The GAPDH products size was 452 bp and used as an internal control for normalization. B, CH-LS001 RT-PCR products from of NHM, NHF, CHM, Donor cell, NT and IVF. The CH-LS001 product size was 310 bp.

있었다. 염기 359~547 bp까지 3' 쪽에서 188 bp의 non-coding region이 존재함을 추정할 수 있었다. CH-SGTS의 amino acid 서열의 hydro-phathic index를 Kyte와 Doolittle (1982)의 방법에 따라 분석한 결과 Fig. 4(A)에서 보는 바와 같이 N-terminal region의 1/2 이상이 hydrophobic이었으며, 평균 hydrophobicity는 0.03으로 소수성 단백질로 추정할 수 있었다. 또한, 추정된 amino acid를 바탕으로 BLAST에서 검사한 결과는 현재까지 알려진 어떤 단백질과도 유사성이 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 가상의 2D 분석과 Hydrophathicity를 분석한 결과 Fig. 4에서 나타난 결과와 같이 하나의 단백질의 형태가 유지됨을 알 수 있었다.

본 유전자를 통해 specific primer를 제작하여 smiquantitative RT-PCR을 분석한 결과 Fig. 5와 같이 정상 송아지 수컷과 암컷에서는 band가 확인되지 않았으며, 복제송아지의 공여세포와 그 공여세포를 이용하여 만든 NT란과 체외 수정란에서도 band가 확인되지 않았다. 복제 송아지 폐조직의 mRNA에서만 band가 확인되었다. 위와 같은 결과에 의해 탐색된 CH-U7M gene이 복제송아지의 폐 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자의 형태를 가지고 있다고 추정할 수 있었으며, 이 유전자는 공여세포, NT란 및 체외 수정란에서는 발현되지 않는 유전자이며, 폐사되었던 복제송아지의 폐조직에선 특이적으로 발현하는 것으로 보아 급후 이 유전자의 기능에 대하여 체계적으로 연구가 되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Poncedo Leon FA, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 280:1256-1258.

2. Clark JC, Tichelaar JW, Wert SE, Itoh N, Perl AK, Stahlman MT, Whitsett JA (2001): FGF-10 disrupts lung morphogenesis and causes pulmonary adenomas *in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:705-715.
3. Dominko T, Mitalpova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL (1999): Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* 60:1496-1502.
4. Gary FB, Adams R, McCann JP, Odde KG (1996): Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45:141-152.
5. Hooft WF, Hanotte O, Wenink PW, Groen AF, Sugimoto Y, Prins H, Teale A (1999): Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (*Syncerus caffer*). *Anim. Genet* 30:214-220.
6. Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ, Robl JM (2001): Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 64:1487-1493.
7. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
8. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y (2000): Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 120:231-237.
9. Michael AI, David HG (1990): PCR protocols : A Guide to Methods and Applications. "Optimization of PCR". Academic Press, Inc.
10. Moore SS, Barendse W, Berger KT, Armitage SM, Hetzel DJS (1992): Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases. *Anim. Genet* 23:463-467.
11. Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Tsunoda Y (2000): Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 53:1439-1448.
12. Ratnam SM, Carmen F, Ding CY, Howells HJ, Clarke TH, Bestor JR, Chaillet, M, Trasler (2002): Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245:304-314.
13. Shijie Li, Yanxin Li, Weihua Du, Lei Zhang, Shuyang Yu, Yunping Dai, Chunjiang Zhao, Ning Li (2004): Aberrant gene expression in cloned bovine of neonatal death. *Biol Reprod* 72(2):258-265.
14. Suzuki T (2000): Nuclear transfer of bovien in Japan. *J of Embryo Transfer* 15(2):5-20.
15. Wakayama T, Perrry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagamachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
16. Wells D, Palva M, Misica H, Robin T, William H, Vivanco (1998): Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle bree. *Reprod Fertil Dev* 10:369-378.
17. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-6535.
18. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
19. Wilson JM, Williams JD, Bondiolo KR, Looney CR, Westhusin ME, McCalla DF (1995): Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Repro Sci* 38: 73-83.
20. 강희완, 권순우, 고승주 (1998): PCR 다형성 밴드유래 DNA Probe에 의한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 특이검출. *한국식물병리학회지* 14(1):164-170.
21. 진동일, 김홍래, 이혜란, 강재구, 윤종택, 성한우, 정진관, 조민래, 박창식. (2004): Proteomics 기법을 이용한 복제태반 분석. *동물번식학회지* 28(2):238.
(접수일자: 2009. 2. 24 / 채택일자: 2009. 3. 20)