

## 공여세포 처리 조건이 형질전환 복제돼지 생산에 미치는 영향

권대진<sup>1</sup> · 광태욱<sup>1</sup> · 오건봉<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 양병철<sup>1</sup> · 임기순<sup>1</sup> · 김진희<sup>2</sup> · 박진기<sup>1</sup> · 황성수<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과

<sup>2</sup>건국대학교 동물생명과학대학

## Effects of Donor Cell Treatments on the Production of Transgenic Cloned Piglets

Dae-Jin Kwon<sup>1</sup>, Tae-Uk Kwak<sup>1</sup>, Keon Bong Oh<sup>1</sup>, Dong Hoon Kim<sup>1</sup>, Byoung-Chul Yang<sup>1</sup>, Gi-Sun Im<sup>1</sup>, Jin-Hoi Kim<sup>2</sup>, Jin-Ki Park<sup>1</sup> and Seongsoo Hwang<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of donor cell treatments on the production of transgenic cloned piglets. Ear fibroblast cell obtained from NIH MHC Inbred minipig was used as control. The GalT knock-out/CD46 knock-in (GalT/CD46) transgenic cell lines were established and used as donor cells. The reconstructed GalT/CD46 embryos were surgically transferred into oviduct of naturally cycling surrogate sows (Landrace × Yorkshire) on the second day of standing estrus. Unlike control (1.2 kV/cm, 75.4%), the fusion rate of the GalT/CD46 donor cells was significantly higher in 1.5 kV/cm, (84.5%) than that of 1.25 kV/cm, (20.2%) ( $p < 0.01$ ). When the number of the transferred embryos were more than 129, the pregnancy and delivery rates were increased to 13/20 (65%) and 5/20 (25%) compared to less than 100 group [1/6 (16.7%) and 0/6 (0%)], respectively. To analyze the effect of donor cell culture condition on pregnancy and delivery rates, the GalT/CD46 donor cells were cultured with DMEM or serum reduced medium. In serum reduced medium group, the pregnancy and delivery rates were improved to 8/12 (66.7%) and 5/12 (41.7%) compared to DMEM group [3/7 (42.9%) and 0/7 (0%)], respectively. In conclusion, it can be postulated that an appropriate fusion condition and culture system is essential factors to increase the efficiency of the production of transgenic cloned piglets.

(Key words :  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase, CD46 (membrane cofactor protein), Gene knock in/out, Serum reduced medium, Transgenic cloned piglet)

### 서 론

사람과 유사한 해부학적 및 생리학적 특성으로 인해 돼지는 수술 또는 이종장기 이식 등 사람의 질병을 연구하기 위한 모델동물로서 수십 년 동안 사용되어 왔다 (Prather 등, 2003; Zhao 등, 2009).

최근에는 이종 장기 이식을 목적으로 human decelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) 및 CD59 등 다양한 종류의 인체면역 거부반응 관련 유전자에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 최근에는 형질전환된 돼지가 생산된 이후 (Dalmasco 등, 1991; Oglesby 등, 1991; Cozzi and White, 1995; Byrne 등, 1997; Loveland 등, 2004), 초급성 면역거부반응 관련

유전자인 alpha-1,3 Galactosyltransferase (GalT)가 제거 (knock-out)된 형질전환 복제돼지가 생산되면서 (Dai 등, 2002; Phelps 등, 2003; Kolber-Simonds 등, 2004; Nottle 등, 2007) 돼지를 이용한 이종 장기 생산 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 국내에서도 GalT knock-out된 형질전환 복제돼지 생산에 성공하면서 (Ahn 등, 2011) 바이오장기용 형질전환 복제돼지 생산 연구가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

하지만 비정상적 메틸화 (Jeong 등, 2009; Park 등, 2011) 또는 유전자 발현 (Park 등, 2010; Ko 등, 2011; Park 등, 2011) 등의 문제점으로 인하여 여전히 형질전환 복제돼지의 생산 효율은 매우 낮은 것이 사실이다. 이러한 낮은 효율을 향상시키기 위하여 복제란 배양 조건 개선 또는 활성화 등 다양한 종류의 처리를 통해 체외에서의 복제

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-31-290-1627, E-mail: hwangss@rda.go.kr

란 발생율을 높이는 연구들이 수행되었다 (Kobayashi 등, 2007; Hwang 등, 2008; Moon 등, 2009; Shim 등, 2009).

따라서 본 연구는 형질전환 복제돼지의 생산 효율을 높이기 위해서 형질전환된 공여세포에 적합한 융합 및 배양 조건 등에 대하여 살펴보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 화학 조성물

본 연구에 사용된 시약은 별도의 표시가 없는 한 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

### 미성숙 난자의 체외성숙

돼지 난소는 도축장에서 채집하여 30~35°C로 유지된 보온병에 침지하여 연구실로 운반하였다. 난소로부터 난자난구복합체 (cumulus-oocyte complexes, COCs)를 회수하여 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA)가 포함된 Tyrode's lactate-Hepes 배양액에서 회수 및 세척을 실시하였다. 여러 층의 난구세포로 둘러싸인 COC를 선별하여 0.1% PVA (w/v), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 0.5 µg/ml luteinizing hormone, 0.5 µg/ml follicle stimulating hormone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10% porcine follicular fluid (pFF) 75 µg/ml penicillin G and 50 µg/ml streptomycin 등이 포함된 TCM-199 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배양액에서 체외성숙을 유도하였다. 배양은 38.5°C와 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 40시간 동안 배양을 실시하였다.

### 공여세포 준비

국립축산과학원에서 보유 중인 NIH MHC Inbred 미니 돼지의 귀세포를 채취하여 세포주로 구축한 다음, 여기에 GalT knock-out/CD46 knock-in (GalT/CD46)시커 형질전환 체세포를 제작하였다. 공여세포는 핵이식을 실시하기 3~4일 전에 DMEM에 10% FBS가 첨가된 배양액 또는 저혈청 배지 (serum reduced medium) (Table 1)에서 배양을 실시하여 배양접시에 95% 이상 자라도록 하였다. 핵이식을 실시하기 직전에 0.05% trypsin으로 1~2분간 처리하여 세포를 부유시킨 후 3차례 이상 DMEM 배양액으로 세척을 실시한 다음 핵이식의 공여세포로 공시하였다.

### 핵이식 과정

체외성숙이 끝난 COC는 0.1% PVA와 0.1% hyaluronidase가 포함된 PBS에서 4분 동안 처리하여 난구세포를 제거하였다. 제1극체가 선명하게 돌출된 난자들만 선별하여 핵이식의 수행난자로 공시하였다. 제1극체와 주변 세포질을 일부분 흡입하여 제핵을 실시한 다음, 제핵 여부는 10 µg/ml 농도의 Hoechst 33342에서 약 15~20분간 처리하여 확인하였다. 형질전환시키지 않은 체세포 (Control)와 형질전환 공여세포 (GalT/CD46)를 제핵된 수행난자의 위관강에 삽입한 다음 약 1시간 정도 배양액에서 안정화를 유도하였다. 재구축 난자는 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0

Table 1. Formulations of serum reduced medium

Ingredients	Catalog No.	Volume
60% DMEM-low glucose	GibcoBRL, #10567	282 ml
40% MCDB-201	Sigma #M6770	188 ml
2% FBS defined	Hyclone #SH30070.03	10 ml
1X ITS*	Sigma #I3146	5 ml
1X LA-BSA	Sigma #9530	5 ml
0.1 mM Ascorbic acid	Wako, #013-19641	5 ml
10 ng/ml EGF	GibcoBRL #13247-051	500 ul
10 ng/ml PDGF-BB	Sigma #P4306	500 ul
1X Penicillin and streptomycin	Sigma #P0781	5 ml
Total volume		500 ml

\* Insulin+transferrin+sodium selenite.

mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.5 mM HEPES가 포함된 0.3 M mannitol 액 속에서 평형을 시킨 다음 1mm 간극의 융합 챔버에서 전기융합장치 (Fujihira Industry Co., Ltd, Japan)를 이용하여 1.2 또는 1.5 kV/cm 전압으로 30 µsec 동안 2회 통전을 실시하였다. 융합이 확인된 재구축 난자는 PZM-3 배양액에서 38.5°C 온도와 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 체외발달을 유도하였다.

### 형질전환 복제란 이식 및 임신 확인

재구축이 확인된 형질전환 복제란은 곧바로 발정기의 대리모에 이식을 실시하였다. 약 80~150개 정도의 형질전환 복제란을 대리모의 양쪽 난관에 동일한 수로 이식하였다. 임신 여부는 이식 후 28일째에 CA430 탐침자 (probe)가 장착된 Mylab 5 초음파 장비 (Vetel Diagnostics, San Luis Obispo, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 통계적 분석

모든 데이터는 Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 분석을 실시하였다. 두 처리 그룹간의 차이는 Chi-square 테스트를 이용하여 분석하였다. 유의차는  $p < 0.05$ 일 때 통계적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 공여세포에 적합한 융합조건 확립

각 공여세포에 맞는 융합 조건을 확립하기 위하여 두 가지 조건의 전압으로 통전을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 일반 미니돼지 체세포를 이용하여 생산한 복제란의 경우 1.2 kV/cm, 조건에서 평균 75% 이상의 융합율이 기록되었다. 동일한 조건으로 형질전환 체세포를 이용하여 융합을 실시한 결과, 융합율이 약 20% 정도 수준으로 급격하게 낮아지는 것을 확인하였다. 여러 전기자극 조건을

Table 2. Effect of electric voltage on fusion rate

Donor cell type	Voltage (kV)	Fusion rate (%)
Control	1.2	75.4±5.0
GalT/MCP	1.2	20.2±3.4 <sup>a</sup>
	1.5	84.5±6.0 <sup>b</sup>

Data were expressed as mean ± standard deviation (SD).  
<sup>a</sup> vs. <sup>b</sup>:  $p < 0.01$ .

Table 3. Effect of the number of the transferred embryos on the production of cloned piglets

No. of embryos	Pregnancy <sup>*</sup>	Delivery <sup>**</sup>
< 100	1/6	X1: aborted
> 129	13/20	X5: delivered X8: aborted

<sup>\*</sup> Measured by ultrasonography at 28 days after the embryo transfer.

<sup>\*\*</sup> The piglets were survived at least 1 day after birth.

실시한 결과, 1.5 kV/cm 조건에서 평균 84.5%의 유의적으로 높은 융합율을 얻을 수 있었다 ( $p < 0.01$ ).

이식된 형질전환 복제란의 숫자가 임신율 및 분만율에 미치는 영향 분석

이식된 복제란의 숫자가 임신율 및 분만율에 미치는 영향을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 이식된 복제란의 숫자가 100개 미만일 경우 임신율은 16.7%로 나타났으며, 태아 발달과정에서 유산이 일어난 것으로 확인되었다. 하지만 이식된 복제란의 숫자가 최소 129개를 넘었을 경우에는 임신율이 약 65%로 나타났고, 이들 중에서 5마리가 분만에 성공한 것으로 확인되었다.

공여세포 배양조건에 따른 임신율 및 분만율 분석

일반적으로 많이 사용되고 있는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배양액으로 배양한 형질전환 체세포의 경우, 7마리의 대리모 중에서 3마리가 임신된 것으로 확인되었으나, 모두 유산되어 형질전환 복제 태아를 생산하지 못하였다. 하지만 저혈청 배지에서 배양한 체세포를 이용한 경우에는 12마리의 대리모 중에서 8마리가 임신에 성공하였으며, 이들 중에서 5마리가 자연분만 또는 Caesarean-

Table 4. Effect of donor cell culture medium on the production of cloned piglets

Medium	Pregnancy <sup>*</sup>	Delivery <sup>**</sup>
DMEM	3/7	X3: aborted
Serum reduced medium	8/12	X5: delivered X3: aborted

<sup>\*</sup> Measured by ultrasonography at 28 days after the embryo transfer.

<sup>\*\*</sup> The piglets were survived at least 1 day after birth.



Fig. 1. The GalT KO/CD46 KI transgenic cloned piglet immediately after Caesarean section.

section으로 형질전환 복제 태아 생산에 성공하였다 (Table 4) (Fig. 1).

## 고 찰

본 연구는 형질전환 체세포를 이용하여 복제돼지를 생산하는데 있어서 공여세포의 특성에 맞는 융합 및 배양 조건 개선을 통한 생산 효율 향상에 대하여 살펴보고자 실시하였다.

일반적으로 전기 자극을 통한 재구축 난자의 융합율은 각 연구실의 특성과 조건에 따라 다소 차이가 나는 것이 사실이다. Miyoshi 등 (2000)은 돼지에서 융합율이 72~79% 정도로 나타난다고 보고하였으며, Kawano 등 (2004)은 제핵 및 세포 삽입 방법에 따라 융합율이 89% 또는 48%로 유의적인 차이가 난다고 보고하였다.

본 연구에서는 Table 2에서 나타난 결과와 같이 일반 미니돼지 귀세포를 이용하여 핵이식을 실시한 결과, 1.2 kV/cm 전기자극 조건에서 융합율이 약 75% 정도로 나타났다. 하지만 동일한 세포를 이용하여 형질전환 체세포로 구축한 다음 핵이식에 사용하였을 때 융합율이 약 20% 수준으로 나타나는 반면, 1.5 kV/cm 조건으로 통전을 실시한 결과, 평균 84% 이상의 융합율을 얻었다. 따라서 각 세포의 특성에 맞는 융합조건을 찾는 것이 양질의 복제란 생산 효율 향상에 매우 중요하다고 할 수 있다.

돼지의 경우, 다른 축종에 비하여 이식하는 난자 수가 많은 것으로 알려져 있다. Fujimura 등 (2008)은 활성화 방법 간에 차이가 나타나는 하지만, 평균 120개 미만으로 이식한 경우보다 평균 148개 정도 이식하였을 때 최고의 복제동물 생산 효율을 얻었다고 보고하였으며, Ahn 등 (2011)은 평균 131개 이상 이식하여 형질전환 복제태아를 생산하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 100개 미만으로 이식한 경우 임신은 되었으나 분만까지 지속되지 못한 반면, 129개 이상 이식한 경우에서 높은 임신율과 분만율을 기록하였다.

돼지에서는 태아 영양외배엽 (conceptus trophectode-

rm)에서 이식 후 11일째부터 분비되기 시작하는 estrogen이 모체의 임신 인식 (recognition of pregnancy)에 매우 중요하다고 보고되고 있다. 이러한 태아 유래 estrogen 합성 현상은 특히 돼지에서 매우 중요하게 여겨지는데, 이것은 estrogen이 모체의 임신 인식뿐만 아니라 자궁의 분비능력을 촉진시키는 역할을 하기 때문이라고 보고되었다 (Heap 등, 1983; Geisert와 Yelich, 1997; Bazer 등, 1998; Jaeger 등 2001). 즉, 많은 수의 복제란을 이식하는 이유는 이식된 복제란이 배반포로 발달하여 estrogen 합성 및 분비를 함으로써 모체의 자궁환경을 착상에 유리하게 할 뿐만 아니라 모체의 임신 인식을 유도하여 결과적으로 임신이 잘 유지되도록 하는데 도움을 주기 때문이라고 추측할 수 있다.

돼지 난자를 체외 배양할 경우 주로 NCSU-23 (Gandhi 등, 2001; Hashem 등, 2006) 또는 PZM-3 (Yoshioka 등, 2002; Im 등, 2004) 등의 배양액을 사용하고 있다. 하지만 공여세포를 배양하는 배양액은 대부분이 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하고 있다. 하지만 복제란 생산에서 공여세포는 유전정보를 담고 있는 가장 중요한 요소 중의 하나라고 해도 과언이 아니다. 따라서 공여세포를 준비하는 과정에서 세포의 특성을 향상시켜줄 배양액에서 형질전환 체세포를 배양할 경우 복제란 생산 효율 향상에 도움이 될 것이라 추측할 수 있다.

본 연구에서 사용된 저혈청 배지의 경우, 일반 체세포 배양액에 비하여 FBS 첨가량은 20% 정도로 낮은 수준이지만, insulin-transferrin-selenium (ITS) 등 다양한 성장 촉진 인자들이 포함되어 있어 세포 배양에 도움이 되는 것으로 보고되고 있다 (Walter 등, 2010). 이러한 ITS 또는 EGF 등을 첨가한 배양액으로 난자 성숙 및 체외배양에 이용하는 경우는 보고되었으나 (Rota와 Cabianca, 2004; Córdova 등, 2010), 본 연구에서처럼 공여세포 배양에 사용한 보고는 확인되지 않았다. 동결보존된 형질전환 체세포를 용해하여 두 종류의 배양액으로 배양을 실시한 결과, 저혈청 배지로 배양한 체세포는 DMEM으로 배양한 세포에 비하여 배양접시에 부착되는 시간도 매우 빨랐을 뿐만 아니라, 세포증식 속도도 빠른 것으로 확인되었다 (data not shown). 이러한 연구 결과는 공여세포를 준비하는 과정에서 FBS뿐만 아니라 추가적으로 성장촉진 인자 등을 첨가할 경우 형질전환 복제태아의 착상과 분만에 까지 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, 형질전환 복제돼지 생산 효율을 향상시키기 위해서는 각 형질전환 공여세포의 특성에 맞는 용합 및 배양 조건 등을 확립하는 것이 필수적이라고 할 수 있다.

## ACKNOWLEDGEMENT

[본 과정은 농촌진흥청 어젠다 프로그램 (과제번호: PJ007189; PJ007849201003) 연구비로 실시되었음.]

## 인용문헌

1. Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang

- MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB, Shim H (2011): Resurrection of an  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
2. Bazer FW, Ott TL, Spencer TE (1998): Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in subprimate mammals. In: Bazer FW (ed) *The Endocrinology of Pregnancy*, Chapter 1. Humana Press, Totowa, pp 1-34.
3. Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS (1997): Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63:149-155.
4. Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T (2010): Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology* 74:1341-1348.
5. Cozzi E, White DJ (1995): The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1:964-966.
6. Dai Y, Vauqht 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. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH (1991): Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 52:530-533.
8. Fujimura T, Murakami H, Kurome M, Takahagi Y, Shigehisa T, Nagashima H (2008): Effects of recloning on the efficiency of production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs. *J Reprod Dev* 54:58-62.
9. Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisner RL (2001): Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev* 58:269-275.
10. Geisert RD, Yelich JV (1997): Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 52:133-149.
11. Hashem A, Hossein MS, Woo JY, Kim S, Kim JH, Lee SH, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Kang SK, Lee BC (2006): Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23 supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids of *in vitro* fertilized porcine embryos. *J Reprod Dev* 52:591-599.
12. Harpe RB, Flint AFP, Staple LD (1983): Endocrinology of trophoblast in farm animals. In: Loke YW, Whyte A (eds) *Biology of Trophoblast*. Elsevier, New York, pp 353-400.

13. Hwang IS, Park MR, Moon HJ, Shim JH, Kim DH, Yang BC, Ko YG, Yang BS, Cheong HT, Im GS (2008): Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax- $\alpha$  and Bcl-xl) in pre-implantation porcine NT embryos. *Mol Reprod Dev* 75:464-471.
14. Im GS, Yang BS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Prather RS (2004): High osmolarity at early culture stage improves *in vitro* development of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos. *Reprod Fertil Dev* 17: 169-169.
15. Jaeger LA, Johnson GA, Ka H, Garlow JG, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW (2001). Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod Suppl* 58:191-207.
16. Jeong YS, Oh KB, Park JS, Kim JS, Kang YK (2009): Cytoplasmic localization of oocyte-specific variant of porcine DNA methyltransferase-1 during early development. *Dev Dyn* 238:1666-1673.
17. Kawano K, Kato Y, Tsunoda Y (2004): Comparison of *in vitro* development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells* 6: 67-72.
18. Ko YG, Im GS, Lee HC, Cho SR, Choi SH, Choi CY, Lee PY, Cho JH, Yoo YH (2011): Non-CPG methylation of Pre-1 sequence in pig SCNT blastocyst. *Reprod Dev Biol* 35:93-97.
19. Kobayashi M, Asakuma S, Fukui Y (2007): Blastocyst production by *in vitro* maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 15: 93-102.
20. Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen 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.
21. Loveland BE, Milland J, Kyriakou P, Thorley BR, Christiansen D, Lanteri MB, van Regensburg M, Duffield M, French AJ, Williams L, Baker L, Brandon MR, Xing PX, Kahn D, McKenzie IFC (2004): Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation* 11:171-183.
22. Miyoshi K, Saeki K, Sato E (2000): Improvement in development of porcine embryos reconstituted with cells from blastocyst-derived cell lines and enucleated oocytes by optimization of reconstruction methods. *Cloning* 2:175-184.
23. Moon HJ, Shim JH, Hwang IS, Park MR, Kim DH, Ko YG, Park CK, Im GS (2009): Effect of FBS (fetal bovine serum) and pFF (porcine follicular fluid) on *in vitro* maturation development of porcine parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Reprod Dev Biol* 33:85-91.
24. Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ, d'Apice AJ (2007): Production of homozygous  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knock-out pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339-344.
25. Oglesby TJ, White D, Tedja I, Liszewski K, Wright L, Van den Bogarde J, Atkinson JP (1991): Protection of mammalian cells from complement-mediated lysis by transfection of human membrane cofactor protein and decay-accelerating factor. *Trans Assoc Am Phys* 104:164-172.
26. Park CH, Uh KJ, Mulligan BP, Jeung EB, Hyun SH, Shin T, Ka H, Lee CK (2011): Analysis of imprinted gene expression in normal fertilized and uniparental preimplantation porcine embryos. *PLoS One* 6 (7):e22216.
27. Park JY, Park, MR, Hwang KC, Chung JS, Bui HT, Kim T, Cho SK, Kim JH, Hwang S, Park SB, Nguyen VT, Kim JH (2011): Comparative gene expression analysis of somatic cell nuclear transfer-derived cloned pigs with normal and abnormal umbilical cords. *Biol Reprod* 84:189-199.
28. Park MR, Kim BK, Lee HC, Lee P, Hwang S, Im GS, Woo JS, Cho C, Choi SH, Kim SW, Ko YG (2010): The imprinted messenger TNA expression in cloned porcine pre-implantation embryos. *J Emb Trans* 25:127-131.
29. 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 (2003): Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
30. Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL (2003): Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59:115-123.
31. Rota A, Cabianca G (2004): *In vitro* maturation rates of canine oocytes from anovulatory bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev* 44:105-109.
32. Shim JH, Park MR, Yang BC, Ko YG, Oh KB, Lee JW, Woo JS, Park EW, Park SB, Hwang S (2009): Developmental characteristics of SCNT pig embryos knocked-out of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene. *Reprod Dev Biol* 33:157-162.
33. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE (2010): Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch

- assays. *Exp Cell Res* 316:1271-1281.
34. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 66:112-119.
35. Zhao J, Ross JW, Hao Y, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS (2009): Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 81:525-530.

(접수일자: 2011. 8. 15 / 채택일자: 2011. 8. 22)