

## 돼지 체세포복제 배반포에서 Pre-1 영역의 Non-CpG 메틸화 양상

고응규<sup>1,†</sup> · 임기순<sup>2</sup> · 이휘철<sup>2</sup> · 조상래<sup>1</sup> · 최선호<sup>1</sup> · 최창용<sup>1</sup> · 이풍연<sup>1</sup> · 조창연<sup>1</sup> · 조재현<sup>3</sup> · 유용희<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, <sup>3</sup>경상대학교 수의과대학

## Non-CpG Methylation of Pre-1 Sequence in Pig SCNT Blastocysts

Yeung-Gyu Ko<sup>1,†</sup>, Gi-Sun Im<sup>2</sup>, Hwi-Cheul Lee<sup>2</sup>, Sang-Rae Cho<sup>1</sup>, Sun-Ho Choi<sup>1</sup>, Chang-Yong Choe<sup>1</sup>, Poongyeon Lee<sup>1</sup>, Changyeon Cho<sup>1</sup>, Jae-Hyeon Cho<sup>3</sup> and Young-Hee Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

### ABSTRACT

Previously, we reported that the osmolarity conditions in the satellite region were affected CpG DNA methylation status while Pre-1 sequence was not affected CpG DNA methylation in pNT blastocyst stage. This study was conducted to investigate the DNA methylation status of repeat sequences in pig nuclear transfer (pNT) embryos produced under different osmolarity culture conditions. Control group of pNT embryos was cultured in PZM-3 for six days. Other two treatment groups of pNT embryos were cultured in modified PZM-3 with 138 mM NaCl or 0.05 M sucrose (mPZM-3, 320 mOsmol) for two days, and then cultured in PZM-3 (270 mOsmol) for four days. The DNA methylation status of the Pre-1 sequences in blastocysts was characterized using a bisulfite-sequencing method. Intriguingly, in the present study, we found the unique DNA methylation at several non-CpG sequences at the Pre-1 sequences in all groups. The non-CpG methylation was hypermethylated in all three groups, including *in vivo* group (86.90% of PZM-3; 83.87% of NaCl; 84.82% of sucrose; 90.94% of *in vivo* embryos). To determine whether certain non-CpG methylated sites were preferentially methylated, we also investigated the methylation degree of CpA, CpT and CpC. Excepting *in vivo* group, preference of methylation was CpT > CpC > CpA in all three groups investigated. These results indicate that DNA methylation of Pre-1 sequences was hypermethylated in CpG as well as non-CpG site, regardless modification of osmolarity in a culture media.

(Key words : NT blastocyst, Methylation, Pre-1, Non-CpG, Osmolarity)

### 서 론

DNA 메틸화는 생물 종을 넘어 가장 많이 연구되는 epigenetic 기구이고, DNA 메틸화는 유전자의 silencing, imprinting, chromatin의 remodeling, X 염색체 불활성화, 같은 다양한 유전자의 기능 조절을 통한 포유동물 발달에 관여하고 있다. 포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있으며, 개체 발생 및 세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 하고 있다(Shiota 등, 2002). 또한, 배우자형성과 초기배발달 과정에 genome-wide DNA 메틸화 리프로그래밍이 일어난다(Reik 등 2001; Ko 등, 2005). 포유류 계통에 있어서 CpG 배열의 60~90%는 메틸화되어 있다. 유전자 영역은 계통 DNA의 수%인 것으로 알려져 있고, 반복배열을 포함하는 비유전자 영역의 많은 CpG 배열이

메틸화 되어 있다. 포유류에서 DNA 메틸화는 주로 CG의 연속 배열에서 대부분 일어나지만, 최근에는 다른 배열의 cytosine이 메틸화 되는 예도 보고되고 있다(Ramsahoye 등, 2000). 이러한 non-CpG는 비대칭적인 CpA, CpT, CpC 연속 배열에서 발견된다. 이들 non-CpG에 관한 논문은 많지 않지만 *Drosophila*의 초기발달 과정에 존재하고(Lyko 등, 2000), Mouse ES cell에서 CpA와 CpT에서 non-CpG 메틸화의 존재를 보고하였다(Dodge 등, 2002; Ramsahoye 등, 2000).

복제동물은 epigenetic 관점에서 세포의 분화나 계통 유전자 발현조절 기구를 명확히 할 수 있는 중요한 생물이나 복제동물은 체세포복제에 따른 DNA 메틸화에 따른 epigenetic 리프로그래밍 이상이 있고(Ohgane 등, 2001; Kremensky 등, 2006), 이들 불완전한 리프로그래밍은 배반포 형성 및 임신 실패의 원인이 된다(Shi 등, 2002). 어쨌든 이들 리프로그래밍은 특정 genome 영역에서 다양한 메커

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-63-620-3535, E-mail: kog4556@korea.kr

니즘에 의해 독립적으로 일어나고(Kim 등, 2004), DNA 메틸화는 초기 배발달 과정의 정상적인 발달과 프로그램된 유전자 발현에 중요하다. 최적 체외배양 시스템은 초기 배발달 메커니즘을 이해하는데 중요한 전략의 하나로 배양 조건에 있어 삼투압 또한 중요한 착상 전 초기배달에 영향을 미치는 중요한 요인의 하나이다. 우리는 복제 효율 향상을 위하여 최적배양 조건을 검토하고 있고, 최근에 고삼투압 배양 조건이 돼지 체세포복제(NT)와 체외수정란(IVF)의 세포의 세포사를 감소시키며 배반포 발달을 증가시키고(Hwang 등, 2007; Park 등, 2008), 또한, 고삼투압에 처리된 복제배반포의 메틸화는 게놈내 반복영역인 Satellite 영역에서는 *in vivo* 배반포에 유사한 고메틸화 경향을 나타냄을 보고하였다(Ko 등, 2010).

본 실험은 고삼투압의 체외배양 조건(NaCl과 sucrose 처리, 270 mOsmol)에서 생산된 돼지 복제 배반포의 genome내 반복 영역인 Pre-1과 Satellite 영역의 DNA 메틸화 양상을 bisulfite sequencing 방법으로 조사하였고, 예상치 않게 이들 반복 영역 중 Pre-1 영역에서 발견된 다양한 non-CpG 특이적인 메틸화 결과를 조명한다.

## 재료 및 방법

### 난자의 회수와 체외성숙

별도의 표기가 없는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였고, 실험에 사용된 동물 관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인을 얻었다. 난자는 도축장에서 도축된 돼지의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 3~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실험현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol(PVA), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 40시간 동안 체외성숙을 실시하였다.

### Donor Cell의 준비

핵이식에 사용된 체세포는 8개월령 미니돼지(Immerge Bio Therapeutics Inc., Cambridge, MA, USA)의 귀에서 생체조직 절편으로부터 채취되었고, 15% (v/v) FBS와 75 ug/ml antibiotics가 함유된 DMEM (Gibo-BRL, Grand Island, NY, USA)으로 배양하였다. 세포는 3~4회 계대배양 후 10% dimethylsulfoxide가 함유된 DMEM에 동결보존 후 용해 공여세포로 핵이식에 사용하였다.

### 체세포 복제란의 생산

성숙된 난자는 4분간 0.1% (w/v) PVA와 0.1% (w/v) hyaluronidase가 포함된 PBS에서 vortexing에 의해 준비되었다. 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 감수분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 시도하였다. 모든 micromanipulation 과정은 3 mg/ml BSA and 5 ug/ml cytochalasin B가 포함된 TCM-199에

서 실시하였다. 난자들은 39°C에서 15분 동안 10 ug/ml의 Hoechst33342의 염색으로 제핵이 확인되었다. 제핵 후 난자들은 donor cell의 핵이식까지 3 mg/ml BSA가 포함된 TCM-199에서 실시되었다. 전기 자극을 통하여 균형적인 세포융합을 위해 핵이식 난자들은 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM HEPES가 포함된 0.3 M mannitol 용액과 함께 fusion chamber의 0.2 mm 직경 와이어 전극(간격 1 mm) 사이에서 BTX Electro Cell Manipulator 2001 (BTX, San Diego, CA, USA) 이용 2DC 전류 1.2 kV/cm를 30 μ/sec 동안 유도하여 융합시켰다. 융합된 난자들은 6일 동안 PZM-3에서 배양되었다. Genomic DNA 추출용 배반포들은 PBS로 4회 이상 세척 후 처리구당 10 개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

### In Vivo 배반포의 회수

*In vivo* 배반포 회수를 위하여 7~11개월령 Landrace 처녀돈을 이용, 과배란처리를 회수하였다. hCG 주사 후 24~36시간에 인공수정시켰고, hCG 주사 후(배란 후 약 120시간) 168시간에 도축 후 생식기를 회수하였다. PBS를 이용 자궁 관류하여 회수된 수정란은 30분 내에 37°C의 0.1%(w/v) PVA를 첨가한 Tyrode's lactate-HEPES를 이용하여 세척 Genomic DNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

### Bisulfite Sequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

우선 Genomic DNA 추출은 Ko 등(2005)의 방법에 준하여 추출하였고, sodium bisulfite genomic sequencing은 Clark 등(1994)의 방법에 따라 수행하였다. 간략히 bisulfite genomic sequencing 방법을 설명하면 EcoRI 처리된 약 2 μg의 genomic DNA가 0.33 M NaOH에서 37°C에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2M의 sodium metabisulfite와 0.5 mM의 hydroquinone 농도로 55°C에서 12시간 빛을 차단하여 반응시켰다. Bisulfite 처리된 샘플은 Wizard DNA clean-Up system(Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. Bisulfite 처리된 DNA는 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)을 이용하여 Pre-1과 satellite 영역을 Table 1의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C에서 10분간 신장시켜 증폭 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후 증폭된 PCR 산물의 염기 서열은 pGEM T-easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝한 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동 염기 서열 분석장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(PE Applied Biosystems, USA) program을 사용하여 분석하였다.

## 결 과

### Pre-1 영역의 Non-CpG 메틸화

본 실험에서는 고삼투압 배양 조건에 따른 게놈내 반복 영역인 satellite와 Pre-1 영역의 DNA 메틸화 변화를 bisulfite sequencing법에 의하여 분석하였다. 우리는 분석한 반복 영역 중 Satellite 영역이 아닌 Pre-1 영역에서 CpG 배열 이외의 cytosine에서도 독특한 메틸화 modification 즉, non-CpG 메틸화가 존재함을 발견하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 Pre-1 영역은 148bp로 8개의 CpG site 이외에 CpA, CpT, CpC site에서 메틸화된 다수의 non-CpG 포함하고 있었다. *In vivo* 배반포뿐만 아니라 PZM-3 처리구, 그리고 NaCl과 sucrose 고삼투압 처리구의 복제 배반포의 모든 non-CpG 메틸화는 각각 90.94%, 86.9%, 83.87% 그리고 84.82% 처리구 간에 큰 차이 없이 고메틸화 경향을 보였다(Fig. 2 and Table 1).

**Pre-1 영역의 Non-CpG 메틸화 선호도**

이들 non-CpG 중 CpA 메틸화는 *in vivo* 배반포에서 80%로 PZM-3, NaCl 그리고 sucrose 처리구의 복제 배반포의 66.67%, 56.10%, 그리고 58.54%보다 고메틸화 되어 있었다(Table 1). CpT 메틸화는 복제란 처리구 모두 100%로 완전히 메틸화된 데 반하여 *in vivo* 배반포의 95.52%로 전반적으로 고메틸화 되었다. CpC 메틸화는 처리구에 관계없이 95% 전후로 고메틸화 경향을 보였다. 이들 결과는 초기배발달 중 배반포 stage에서 genome내 Pre-1 반복 영역에 CpG site 이외에 CpA, CpT 그리고 CpC si-

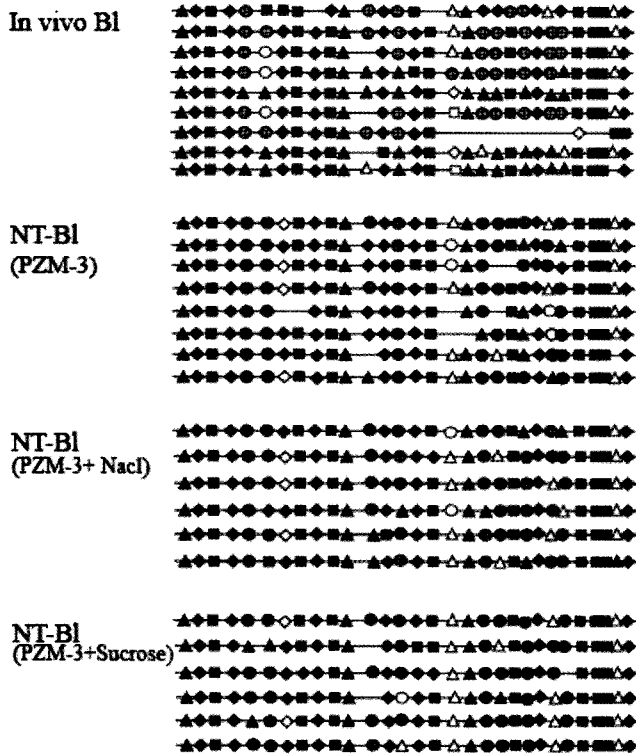


Fig. 1. Methylation profiles of the Pre-1 sequence of pig embryos produced *in vivo* or SCNTs. Each string indicates a 148 bp fragment of Pre-1 sequences amplified by PCR from bisulfite-converted genomic DNA and has 8 CpG sites. Circles represent CpG dinucleotides, diamond represent CpCs, triangles represent CpAs, and squares represent CpTs. Solid and open symbols denote methylated and unmethylated cytosine, respectively.

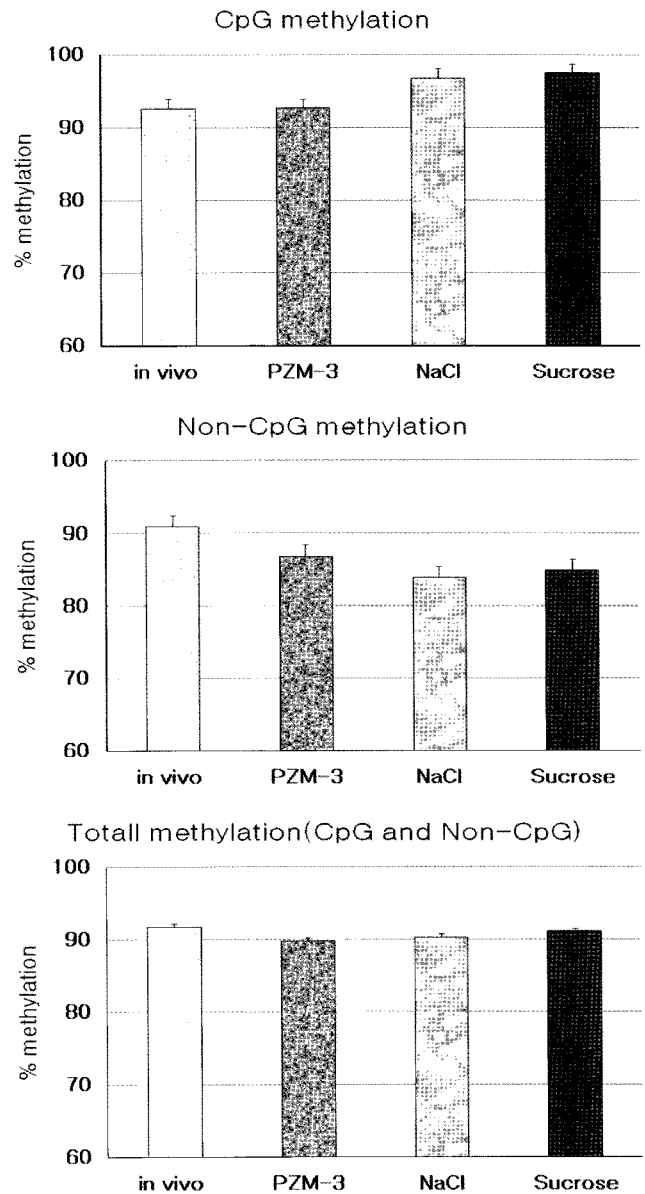


Fig. 2. CpG and non-CpG methylation patterns of Pre-1 sequence in *in vivo* or SCNTs. Percent methylation (mean±SD) is the proportion of methylated CpNs sites relative to the whole CpG and non-CpG (CpA, CpT and CpC) sites.

te의 모든 cytosine에서 고메틸화 양상이 나타나는 non-CpG 메틸화가 존재하며, 이들 non-CpG 메틸화 선호양상은 cpT>CpC>CpA 순으로 높게 나타났다. 이들 결과는 Pre-1 영역의 DNA 메틸화 상태는 삼투압 변화를 준 체세포 배양 조건에 변화 없이 안정적으로 CpG 뿐만 아니라 non-CpG site가 고메틸화 되어짐을 의미하고 있다.

**고찰**

우리는 최근에 고삼투압 배양 조건이 돼지 체세포복제

Table 1. CpG and non-CpG methylation in the Pre-1 sequences of pig embryos produced *in vivo* or SCNTs

Classification	No. of clones	% methylation				
		CpG	CpA	CpT	CpC	Total non-CpG
<i>In vivo</i>		92.68	80.00	95.92	96.91	90.94
PZM-3		92.73	66.67	100.00	94.03	86.90
NaCl		96.76	56.10	100.00	95.92	83.87
Sucrose		97.50	58.74	100.00	95.92	84.82

This data was used to compile the percent methylation as (number of possible retained cytosines)/(maximum possible retained cytosines)×100 for each of above CpGs and CpNs. Total non-CpG represents the summarized percentage of methylation at all non-CpGs (CpAs, CpTs and CpCs).

(NT)와 체외수정란 (IVF)의 배반포에서 세포의 세포사를 감소시키고 배반포까지의 발달율이 증가됨을 확인하였다 (Hwang 등, 2007; Park 등, 2008). 또한 고삼투압에 처리된 복제배반포의 메틸화는 게놈내 반복 영역인 Satellite 영역에서는 *in vivo* 배반포에 가까운 유사한 고메틸화 경향을 보이고, Pre-1 영역에서는 DNA 메틸화 상태는 삼투압 변화를 준 체세포 배양 조건에 변화 없이 안정적인 상태로 체세포 복제에 따른 후성학적 변화가 없음을 확인하였다(ko 등 2010).

본 실험에서는 고삼투압 체외배양 조건에 따른 genome내 반복 영역의 CpG DNA 메틸화의 변화를 분석하고자 실시하였으나, 예상치 않게 이들 Pre-1 영역에 독특한 non-CpG 배열에 특이적인 메틸화가 존재함을 발견하였다. 이러한 non-CpG 메틸화 현상은 식물과 동물에서 모두 보고되었고, 식물에서는 RNA-directed 메틸화와 non-CpG site의 메틸화와 직접적인 관련이 되고(Pelissier 등, 1999), 이러한 식물의 non-CpG 메틸화 증거는 *Arabidopsis thaliana chromomethylase3* gene의 homologous 활성에 기인하는 것으로 알려져 있다(Jones 등, 2001). 동물 세포에서는 non-CpG 메틸화 endogenous LINE-1 retroelements(Woodcock 등, 1997)와 integrated plasmid DNA (Clark 등, 1995), *Nf1* gene (*neurofibromatosis type1*) coding 영역(Haines 등 2001), 그리고 Mouse ES cell에서 CpA와 CpT에서 non-CpG 메틸화의 존재가 확인되었다(Dodge 등, 2002; Ramsahoye 등, 2000). 우리의 결과에서도 초기배발달 중 배반포 stage에서 genome내 Pre-1 반복 영역에 CpG site 이외에 CpA, CpT 그리고 CpC site의 모든 cytosine에서 고메틸화로 non-CpG 메틸화가 존재하였다. 이처럼 non-CpG 메틸화 특정유전자 영역과 반복배열을 포함하는 비유전자 영역에서 초기배발달 동안에 존재하는 것 같다. 그리고 우리 결과는 체세포 배양 조건에 관계없이 Pre-1 반복 영역에서 고메틸화된 CpA, CpT 그리고 CpC site의 모든 non-CpG 메틸화 선호양상은 cpT > CpC > CpA 순으로 높게 나타났다. 이들 결과는 Pre-1 영역의 DNA 메틸화 상태는 삼투압 변화를 준 체세포 배양 조건에 변화 없이 안정적으로 CpG뿐만 아니라 non-CpG site가 고메틸화 되어짐을 의미하고 있고, Lindroth 등(2001)은 CpG 메틸화의 존재가 그 주변 CpNpG 배열에 메틸화를 유기한다고 보고한 것처럼, 우리의 결과에서도 Pre-1 영역의 CpG 고메틸화와 non-CpG는 서로 link되

어 서로 간에 메틸화를 유도하는 것 같다. 생화학적 연구 결과는 non-CpG 메틸화는 *Dnmt3a* and *Dnmt3b*가 CpG > CpA/CpT > CpC 순으로 기질 특이성이 있음(Aoki 등, 2001; Dodge 등, 2002)을 또 다른 보고는 *Dnmt3* family 메틸화 효소들이 mouse ES cells에서 non-CpG 메틸화를 책임지는 것으로 보고하였다(Ramsahoye 등, 2000).

DNA 메틸화 프로파일의 적절한 형성은 정상적인 분화와 발달의 기초가 되기 때문에 복제 동물의 발달을 평가하는데 이용될 수 있을 것이고, 복제에서 나타나는 여러 가지 이상 중 특히 초기 배발달 과정의 상세한 Epigenetic 메커니즘을 이해하는 것이 중요할 것이다.

## 인용문헌

1. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, Tajima S (2001): Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 29: 3506-3512.
2. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997.
3. Clark SJ, Harrison J, Frommer M (1995): CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet* 10:20-27.
4. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, Li E (2002): *De novo* methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene* 289: 41-48.
5. Haines TR, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ (2001): Allele-specific non-CpG methylation of the *Nf1* gene during early mouse development. *Dev Biol* 240: 585-598.
6. Hwang IS, Park MR, Moon HJ, Shim JH, Kim DH, Yang BC, Ko YG, Yang BS, Cheong HT, Im GS (2007): Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (*Bax- $\alpha$*  and *Bcl-xl*) in preimplantation porcine NT embryos. *Mol Reprod Dev* 75:464-471.

7. Kim SH, Kang YK, Koo DB, Kang MJ, Moon SJ, Lee KK, Han YM (2004): Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:58-63.
8. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K (2005): Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem* 280:9627-9634.
9. Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC (2001): RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 11:747-757.
10. Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K (2006): Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine Leptin and POU5F1 genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52:277-285.
11. Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE (2001): Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077-2080.
12. Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000): DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408:538-540.
13. Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2001): DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30:45-50.
14. Park MR, Hwang IS, Shim JH, Moon HJ, Kim DH, Ko YK, Seong HH, Im GS (2008): Effect of osmolarity of culture medium on imprinting and apop-  
totic gene expression in miniature pig nuclear transfer embryos. *Reprod Dev Biol* 32(3):183-191.
15. Pelissier T, Thalmeir S, Kempe D, Sanger HL, Wassenegger M (1999): Heavy *de novo* methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 27: 1625-1634.
16. Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000): Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci* 97: 5237-5242.
17. Reik W, Dean W, Walter J (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093.
18. Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N (2002): Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7:961-969.
19. Shi W, Haaf T (2002): Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63:329-334.
20. Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD (1997): Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272: 7810-7816.
21. 고응규, 임기순, 박미령, 우제석, 양병철, 황성수, 이휘철, 이풍연, 조창연, 최순호, 유용희 (2010): 삼투압 배양 조건에 따른 돼지 체세포 복제 배반포에서 Repeats 영역의 DNA 메틸화 변화. *한국동물번식학회지* 34:181-184.  
(접수일자: 2011. 2. 26 / 채택일자: 2011. 3. 3)