

α 1,3-Galactosyltransferase(GalT) 유전자가 완전 Knock-out(-/-)된 바이오장기용 형질 전환 돼지 생산

황성수¹, 오건봉¹, 김동훈¹, 우제석¹, 심호섭², 윤익진³, 박진기¹, 임기순^{1,*}

¹국립축산과학원 동물바이오공학과, ² 단국대학교 나노바이오의학과, ³건국대학교병원 외과

Production of α 1,3-Galactosyltransferase (GalT) Double Knock-out (-/-) Transgenic Pigs for Xenotransplantation

Seongsoo Hwang¹, Keun Bong Oh¹, Dong-Hoon Kim¹, Jea-Seok Woo¹, Hosup Shim²,
Ik-Jin Yun³, Jin-Ki Park¹ and Gi-Sun Im^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Department of Nanobiomedical Science, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

³Department of Surgery, Konkuk University Medical Center, Seoul 143-729, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to analyze the transgenic efficiency and sex ratio in α -1,3-galactosyltransferase (GalT) knock-out (KO) transgenic pigs according to generation. GalT KO piglets were produced by artificial insemination or natural mating. The transgenic confirmation of GalT KO was evaluated by PCR amplification using specific primers. After electrophoresis, three types of bands were detected such as 2.3 kb single band (Wild), 2.3 and 3.6kb double bands (GalT KO +/-; heterozygote), and 3.6kb single band (GalT KO -/-; homozygote). Transgenic efficiency in F₁ generation was 64.5% (23/35) of GalT KO (-/+). In F₂ generation, GalT KO transgenic efficiency was 36.4% (21/57, Wild), 47.5% (28/57, GalT KO +/-), and 16.1% (8/57, GalT KO -/-), respectively. Interestingly, no homozygote piglets were born in 6 deliveries among total 11 deliveries, although they were pregnant between male (M) and female (F) F₁ heterozygote. In the 5 litters including at least one GalT KO -/- piglet, the transgenic efficiency was 13.3% (2/24, Wild), 51.3% (14/24, GalT KO +/-), and 35.3% (8/24, GalT KO -/-), respectively. The sex ratio of M and F was 40:60 in F₁ and 49:51 in F₂ generation, respectively. Based on these results, GalT KO transgenic pigs have had a reproductive ability with a normal range of transgenic efficiency and sex ratio.

(Key words : α -1,3-galactosyltransferase, gene knock-out, artificial insemination, transgenic cloned pig, transgenic efficiency)

서 론

체세포 복제 기법은 자연적으로 우수한 형질을 가진 개체 또는 원하는 특정 형질을 가진 개체를 무제한으로 생산이 가능하다는 이론적 배경을 바탕으로 개발되었다. 양(Campbell 등, 1996), 소(Kato 등, 1998), 염소 (Baguisi 등, 1999) 및 돼지 (Polejaeva 등, 2000) 등 여러 종에서 체세포 복제 동물이 생산되었다고 보고되었다.

이들 동물 중에서 특히 돼지의 경우는 사람과 유사한 해부학적 및 생리학적 특성으로 인해 수술 또는 이종 장기 이식 등 사람의 질병을 연구하기 위한 모델 동물로써 사용되고 있다(Vo-dicka 등, 2005; Dehoux와 Gianello, 2007; Prather 등, 2008;

Matsunari와 Nagashima, 2009; Zhao 등, 2009).

심각한 사람의 장기 부족 현상을 극복하기 위한 방법 중의 하나로 대체(alternative) 동물의 장기를 이종 장기의 공급원으로 사용하고자 하는 이종 장기 이식 연구가 시작되었다(Evans, 2001). 하지만 돼지와 영장류 간의 이종간 장기이식에 있어서 가장 큰 장애는 돼지 세포의 표면에 존재하는 terminal α -1,3-galactosyl epitopes이다(Lai 등, 2002; Puga 등, 2009). 이 α -1,3-Galactosyltransferase(GalT) 당단백질은 초급성 면역 거부 반응(hyperacute immune rejection)과 직접적으로 관련이 있는 것으로 알려져 있으며(Cooper 등, 1993a, b; Lambrigts 등, 1998), 이 유전자를 제거(knock-out, KO)한 형질 전환 복제 돼지가 생산되면서(Dai 등, 2002; Phelps 등, 2003; Kolber-Simonds 등, 2004;

* 본 과제는 농촌진흥청 어젠다 프로그램(과제번호: PJ008587; PJ008331) 연구비로 실시되었음.

* Correspondence : E-mail : gsim@rda.go.kr

Nottle 등, 2007) 돼지를 이용한 이중 장기 생산 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

국내에서도 GalT가 KO된 체세포를 이용한 복제란의 생산에 관한 연구가 수행되었고(Shim 등, 2009), 2009년에 우리나라에서 처음으로 GalT KO 형질 전환 복제 미니 돼지의 생산에 성공하였다(Ahn 등, 2011). 또한 바이오장기용 돼지의 사육(김 등, 2011) 및 면역 특성 연구가 수행되었다(Min과 Park, 2011).

바이오장기용 GalT가 KO된 돼지의 장기를 이종이식용으로 활용하기 위해서는 heterozygote(GalT KO $-/+$) 상태가 아닌 homozygote(GalT KO $-/-$) 상태의 돼지가 필요하다. 이를 위해서는 Wild와 GalT KO($-/+$) 간의 교배 그리고 생산된 GalT KO($-/+$) 간의 교배를 통해서 GalT KO($-/-$) 형질 전환 돼지 축군을 조성해야만 한다. 하지만 아직까지 이들 GalT KO 형질 전환 돼지 후대에서의 형질 전환 효율 또는 자웅의 성비를 등에 대한 기본적인 연구가 전혀 보고된 적이 없었던 것이 사실이다.

따라서 본 논문의 목적은 기존에 생산된 GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제 미니 돼지로부터 GalT KO($-/-$) 형질 전환 돼지를 생산하는 과정에서 수집된 형질 전환 효율과 성비(sex ratio)에 대해서 분석하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 형질 전환 복제 미니 돼지 생산

본 연구에서 사용된 GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제 미니 돼지 생산에 관한 결과는 Ahn 등(2011)에 자세히 설명이 되어 있다. 간단히 요약하면 GalT KO된 체세포를 공여세포로 복제란을 생산한 다음 대리모에 이식한 결과, 3두의 형질 전환 복제돼지를 생산하였으나 분만 직후 폐사하였다. 이들의 체세포를 공여세포로 복제란을 생산하여 대리모에 이식하였으며, GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제 미니 돼지 2두를 생산하였다.

2. 정액 동결 및 융해

GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제 미니 돼지의 동결 정액 제조 방법은 우 등(2011)의 방법에 준하여 실시하였다. 요약하면, 정액 채취 후 희석정액을 상온(25°C)에서 1시간 정도 정치시킨 다음 원심분리(400×g, 15°C, 10분)하였다. 1차 동결액(11% α -lactose 용액 80 ml+egg yolk 20 ml)을 정자 농도 1×10^9 이 되도록 첨가하여 5°C까지 90분 동안 냉각시켰다. 이후 2차 동결액[1차 동결액+1.5% Orvus Es Paste(Nova Chem., U.S.A)+9% glycerol]을 1차 동결액량의 1/2을 첨가하여 0.5 ml straw에 주입하여 액체질소에 침지하여 보관하였다.

3. 인공수정 및 자연교미

동결 정액을 이용한 인공수정의 경우 동결된 각 straw는 온탕기(water bath)를 이용하여 55°C에서 13초 동안 융해한 다

음 Beltsville Thawing Solution(BTS) 희석제(205.4 mM glucose, 3.358 mM EDTA, 20.4 mM sodium citrate, 14.879 mM sodium bicarbonate, 10.06 mM potassium chloride)와 혼합 후 원심분리(400×g, 37°C, 10분)하여 상층액을 제거한 다음 BTS로 부유하였다. 부유된 정액은 발정이 확인된 YL(Yorkshire×Landrace) 교잡종 암돼지의 질 내에 주입하여 인공수정을 실시하였다. 한편 일반 액상정액을 이용한 인공수정의 경우 GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제 미니 돼지(F_0)에서 정액을 채취하여 BTS로 희석한 다음 발정이 확인된 YL 교잡종 암돼지의 질 내에 40 ml씩 약 18시간 간격으로 2회에 걸쳐 주입하였다. 발정 확인은 발정주기에 있는 암돼지 중에서 음순의 팽윤 정도와 고미반응을 통해 확인하였다. 자연교미의 경우는 발정이 확인된 암컷 GalT KO($-/+$) F_1 형질 전환 돼지를 수컷 GalT KO($-/+$) F_1 형질 전환 돼지와 합사시켜 임신 유도하였다.

4. 형질 전환 검증

GalT KO($-/+$) 형질 전환 돼지로부터 태어난 F_1 과 F_2 후대 돼지들의 성비(sex ratio)를 확인한 다음 이들의 꼬리 또는 귀 조직 일부를 채취하여 100 μ g/ml의 proteinase K가 첨가된 조직 용해 용액[10 mM Tris-Cl-pH 8.0, 0.1M EDTA, 0.5% SDS(W/V)]에 침지하여 50°C에서 5시간 동안 용해시켰다. 그 후, phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 형질 전환 여부를 확인하기 위하여 141F(5'-AATGGTGGAGAGTAGCTGGGAATGTTACAG-3')와 136R(5'-TTATAGAGAAACAAGAGTCCTAATTGACTTGT-3') 염기서열을 가진 프라이머를 사용하여 PCR 분석을 실시하였다(Fig. 1). PCR 증폭을 실시한 후 전기영동을 실시하여 2.3 kb 크기에서 단일밴드만 확인이 되면 Wild, 2.3 kb와 3.6 kb 두 개의 밴드를 나타내는 후대를 GalT KO($-/+$) 형질 전환 돼지라고 판단하였으며, 3.6 kb 크기에서 단일 밴드만 확인이 되면 GalT KO($-/-$) 형질 전환 돼지라고 판단하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

GalT KO($-/+$) 형질 전환 복제돼지 F_0 로부터 생산된 후대에서의 형질 전환 효율을 분석한 결과는 Table 1과 같다. GalT

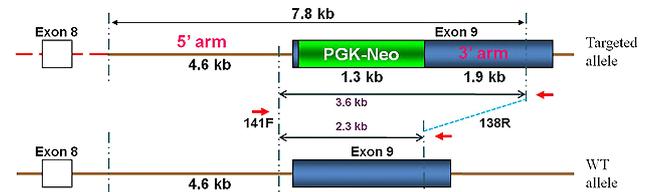


Fig. 1. Structure of the vector for targeting GalT locus. Arrows indicate the PCR primers used to verify successful targeting events.

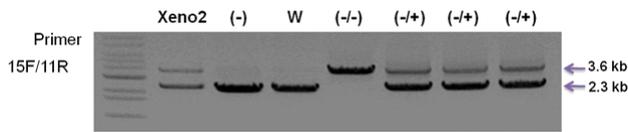


Fig. 2. Confirmation of GalT KO in F₂ piglets. Xenot 2: GalT KO -/+ F₀: (-): negative control (normal pig); W: 2.3 kb single band (Wild); (-/-): 3.6 kb single band (homozygote); (-/+): 2.3 and 3.6kb double bands (heterozygote).

KO(-/+) 형질 전환 복제돼지F₀로부터 생산된 F₁에서의 형질 전환 효율은 총 35마리의 생산된 F₁ 중에서 23마리가 GalT KO(-/+)가 되었음을 확인하였으며, 형질 전환 효율은 64.5%로 나타났다. 생산된 GalT KO(-/+) F₁ 돼지 중에는 GalT KO(-/+) 형질 전환 복제돼지 F₀의 동결정액을 이용하여 생산한 F₁ 2마리가 포함되어 있다.

또한 GalT KO(-/+) F₁끼리의 교배에 의해 생산된 F₂ 세대는 현재까지 총 57두가 생산되었다. 이들 중에서 Wild는 21두 (36.4%), GalT KO(-/+) 28두(47.5%)와 GalT KO(-/-) 8두 (16.1%)(Fig. 3) 비율로 형질 전환되어 약 64%의 형질 전환 효율을 보였다. 하지만 두 세대 모두에서 표준편차가 매우 커서 각 형질 전환 세대간 또는 그룹 간의 통계적 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 생산된 개체의 수가 많지 않은 것과 아직까지 안정적으로 후대에까지 형질 전환 되는 것이 아님을 보여주는 결과라 하겠다.

국립축산과학원에서 생산된 복제 소와 후대에서의 경우 정상적인 번식능력을 가지고 있음을 보고하였다(배 등, 2007; 2009). 분석에 사용된 복제 수소 2두의 경우, 일반 한우 중모우와 비교하여 정액의 양, 정자의 농도 및 동결융해 후의 생존성 등에서 차이가 나타나지 않았으며, 오히려 운동성, 곡선 운동 속도 (VCL), 직선 운동 속도(VSL) 및 평균 진행 속도(VAP) 등은 복제 수소의 정액이 일반 중모우의 정액에 비하여 유의적으로 높은 것으로 보고하였다. 또한 이들 복제 수소의 정액으로



Fig. 3. Production of GalT KO -/- (homozygote) transgenic pig for xenotransplantation.

역시 국립축산과학원에서 생산된 체세포 복제 한우 암소에 인공수정을 실시하여 복제 후대를 생산하였다고 보고하였다.

본 연구에서 사용된 GalT KO(-/+) 형질 전환 복제 미니 돼지 역시 체세포 복제기법을 이용하여 생산하였고(Ahn 등, 2011), 인공수정 또는 자연교미 방법으로 후대를 생산하여 정상적인 번식능력이 있음을 확인하였다. 또한 이들로부터 생산된 F₁ 세대 또한 F₂ 세대를 생산함으로써 번식능력에는 이상이 없다는 것을 확인하였다.

Kolber-Simonds 등(2004)은 GalT KO(-/-) 체세포를 개발하여 GalT KO(-/-) 형질 전환 복제돼지를 생산하였다고 보고하였다. 또한 개발된 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지의 영양류 이식과 바이오장기의 생존기간에 대한 보고는 있지만, 개발된 GalT KO(-/+) 형질 전환 돼지 또는 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지들의 번식능 또는 후대 생산과 관련된 보고는 찾을 수가 없었다.

GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지가 태어난 5마리의 F₁ 모체로부터 태어난 F₂ 후대들에 대한 GalT KO 형질 전환율을 분석한 결과는 Table 2와 같다. F₁ 형질 전환 돼지로부터 태어난 F₂의 경우 한배에서 평균 5.3마리가 태어난 것으로 확인되었다. 한 마리의 모체에서 한 마리라도 GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지가 태어난 경우와 태어나지 않은 경우로 구분하여 분석한 결과, GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지가 한 마리도 태어나지 않은 그룹에서는 총 33마리가 태어났으나, GalT KO(-/+) 형질 전환된 개체는 15마리로 약 44%로 확인되었다. 반면에 GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지가 한 마리라도 태어난 5마리의 모체로부터 생산된 개체는 총 24마리로써 이들 중에서 GalT 유전자가 전혀 형질 전환되지 않은 개체(Wild)는 2마리로 약 13%로 나타났으며, GalT KO(-/+) 유전형질을 가지고 태어난 개체는 14마리로 파악되어 약 51%의 형질 전환 효율

Table 1. Transgenic efficiency according to generation

Generation	No. of piglets delivered			
	Total	Wild	GalT KO (-/+)	GalT KO (-/-)*
F ₀	2		2	
F ₁	35	12 (35.5 ± 22.2)	23 (64.5 ± 22.2)	
F ₂	57	21 (36.4 ± 33.8)	28 (47.5 ± 29.3)	8 (16.1 ± 19.7)

* Calculated the data from the group including at least one GalT KO(-/-) piglets in the same litter.

Table 2. Transgenic efficiency in F₂ generation

Litter*	No. of piglets delivered			
	Total	Wild	GalT KO (-/+)	GalT KO (-/-)
-	33	18 (55.7 ± 30.5)	15 (44.3 ± 30.5)	-
+	24	2 (13.3 ± 21.7)	14 (51.3 ± 30.7)	8 (35.3 ± 10.9)

Data were expressed as mean ± SD.

-: no GalT KO(-/-) piglets in the same litter; +: at least one GalT KO(-/-) piglets in the same litter.

을 나타내었다. 그리고 GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지는 8마리로써 약 35%의 형질 전환 효율을 보였다.

본 연구결과에서 F₁ 세대끼리의 교배를 통해 F₂를 생산한다고 하더라도 전체 11마리의 모체 중 6마리에서 GalT KO(-/-)된 형질 전환 돼지가 한 마리도 생산되지 않았다. 그리고 이들로부터 생산된 F₂ 세대 중에서 약 56%가 GalT 유전자가 형질 전환되지 않은 Wild 개체로 태어났다. Park 등(2006)은 유전자 미세주입(microinjection) 방법으로 형질 전환된 recombinant human erythropoietin(rhEPO) 돼지의 세대 간 형질 전환 효율은 F₁ 세대에서 약 18%로 나타났지만 F₂ 세대에서는 약 67%로 나타나는 것으로 보고하였다. 하지만 이러한 결과는 목적 유전자를 적중(knock-out)시킨 체세포 복제방법과 형질 전환 효율을 직접적으로 비교하기에는 어렵다고 하겠다.

바이오장기용으로 개발된 GalT KO 형질 전환 돼지의 경우 GalT KO(-/-) 여부를 확인하는 것이 가장 중요하기 때문에, GalT KO(-/-)된 개체들 간의 교배를 통해서 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지 축군을 조성할 예정이다. 따라서 세대 간에 전이되는 형질 전환 효율을 많은 개체로부터 누적된 수치로 데이터화 하기는 현실적으로 어려움이 있는 것이 사실이다.

인공수정 또는 자연교미 방법을 이용하여 GalT KO(-/+) 형질 전환 돼지 F₀로부터 생산한 F₁ 또는 F₂ 세대에서의 성비를 분석한 결과는 Table 3과 같다. F₁ 세대의 경우 자축(우)은 60%(21/35)로 나타났으며, 웅축(♂)은 약 40%(14/35)두가 태어났다. 반면 F₂ 세대의 경우 자축(우)은 약 51%(29/57), 그리고 웅축(♂)은 49%(28/57)가 태어났다.

본 연구 결과에서는 비록 적은 수의 개체를 대상으로 분석되었으나, F₁ 세대의 경우 자축의 비율이 다소 높은 경향을 나타내었으며, F₂ 세대에서는 Wild, GalT KO(-/+) 및 GalT KO(-/-) 개체 모두에서 유사한 비율로 나타났다. 돼지의 경우 순종, 2종 교배 및 3종 교배 간에 생산된 후대의 성비는 50:50으로 나타났다고 보고되었다(Hale과 Bondari, 1986). 또한 Lamberson 등(1988)은 첫 번째 발정과 성비 간에 밀접한 상관관

Table 3. Analysis of sex in GalT KO piglets according to generation

Gene-ration	Sex	No. of piglets delivered			
		Total	Wild	GalT KO (-/+)	GalT KO (-/-)
F ₀	♂	2		2	
F ₁	♀	21	7	14	
	♂	14	5	9	
F ₂	♀	29	10	15	4
	♂	28	12	12	4

계가 있으나, 일반적으로 성비는 50:50에서 유의적으로 벗어나지 않는다고 보고하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 바이오장기용으로 생산된 GalT KO(-/+) 형질 전환 복제돼지가 번식적으로 정상임을 확인하였고, 이들로부터 이종 이식이 가능한 바이오장기 생산용 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지 축군 조성이 가능하다는 것을 보여주는 결과라 하겠다.

결론

본 연구의 목적은 기존에 생산된 GalT KO(-/+) 형질 전환 복제 미니 돼지로부터 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지를 생산하는 과정에서 수집된 형질 전환 효율과 성비(sex ratio)에 대해서 분석하고자 실시하였다. GalT KO된 형질 전환 돼지는 인공수정 또는 자연교미 방법을 통하여 생산하였다. GalT KO 여부를 확인하기 위하여 PCR 방법을 이용하였다. PCR 증폭을 실시한 후 전기영동을 실시하여 2.3 kb 크기에서 단일밴드만 확인이 되면 Wild, 2.3 kb와 3.6 kb 두 개의 밴드를 나타내는 후대를 GalT KO(-/+) 형질 전환 돼지라고 판단하였으며, 3.6 kb 크기에서 단일 밴드만 확인이 되면 GalT KO(-/-) 형질 전환 돼지라고 판단하였다. F₁ 세대에서의 형질 전환 효율은 GalT KO(-/+, heterozygote)가 64.5%(23/35)로 나타났고, F₂ 세대에서의 형질 전환 효율은 36.4%(21/57, Wild), 47.5%(28/57, GalT KO -/+) 및 16.1%(8/57, GalT KO -/-)로 각각 표현되었다. 흥미로운 것은 비록 GalT KO -/+ 끼리의 교배라 하더라도 한배에서 한 마리의 GalT KO 개체가 태어나지 않은 경우가 6 모체나 되었다. 최소 한 마리 이상의 GalT KO -/+ 형질 전환 돼지가 태어난 5 모체의 경우 형질 전환 효율은 13.3%(2/24, Wild), 51.3%(14/24, GalT KO -/+) 및 35.3%(8/24, GalT KO -/-)로 나타나 표현형에서 차이가 많이 나타남을 확인할 수 있었다. 후대에서의 성비를 분석한 결과, 웅축과 자

축의 비율이 F₁ 세대에서는 40:60 그리고 F₂ 세대에서는 49:51의 비율로 태어났다. 이상의 결과를 종합하여 보면 바이오장기용으로 생산된 GaT KO(-/+) 형질 전환 복제 돼지가 번식적으로 정상임을 확인하였고, 이들로부터 이종이식이 가능한 바이오장기 생산용 GaT KO(-/-) 형질 전환 돼지 축군 조성이 가능하다는 것을 보여주는 결과라 하겠다.

참고문헌

- 김해성, 전유별, 광성성, 정승아, 정의만, 현상환, 정의배. 2011. 바이오장기 연구를 위한 이동식 아이솔레이터 내 복제 미니 돼지의 생리 활성 평가. *J. Emb. Trans.* 26:165-169.
- 배성훈, 양병철, 고응규, 오건봉, 성환후, 민관식, 박응우, 박수봉, 황성수. 2009. 체세포 복제 한우 수송아지의 성장 특성과 번식생리적 변화. *J. Emb. Trans.* 24:177-182.
- 배성훈, 황성수, 양병철, 고응규, 김동훈, 임기순, 최화식, 진동일, 양보석, 성환후. 2007. 체세포 복제 한우 수소의 정액 성상, 정자의 활동성 및 수정 능력 분석. *Reprod. Dev. Biol.* 31:139-143.
- 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 and Shim H. 2011. Resurrection of an α -1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17:456-461.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Cooper DK, Good AH, Koren E, Oriol R, Malcolm AJ, Ippolito RM, Neethling FA, Ye Y, Romano E and Zuhdi N. 1993b. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl. Immunol.* 1:198-205.
- Cooper DK, Koren E and Oriol R. 1993a. Genetically engineered pigs. *Lancet* 342:682-683.
- 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 and Ayres DL. 2002. Targeted disruption of the α -1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20:251-255.
- Dehoux JP and Gianello P. 2007. The importance of large animal models in transplantation. *Front. Biosci.* 12:4864-4880.
- Evans RW. 2001. in *Xenotransplantation*, Platt JL (ed) ASM Press, Washington DC, pp. 29-51.
- Hale OM and Bondari K. 1986. Effect of crossbreeding on genetic improvement of growth and reproduction in pigs. *Growth* 50:526-536.
- Kato Y, Tani T, Sotomary Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Am S, Augenstein ML, Bethausser 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 and Hawley RJ. 2004. Production of α -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.
- 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 and Prather RS. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
- Lamberson WR, Blair RM, Rohde Parfet KA, Day BN and Johnson RK. 1988. Effect of sex ratio of the birth litter on subsequent reproductive performance of gilts. *J. Anim. Sci.* 66:595-598.
- Lambrigts D, Sachs DH and Cooper DK. 1998. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* 66:547-561.
- Matsunari H and Nagashima H. 2009. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *J. Reprod. Dev.* 55:225-230.
- Min G and Park JY. 2011. Alpha 1,3-galactosyltransferase deficiency in miniature pigs increases Non-Gal Xenoantigens. *Reprod. Dev. Biol.* 35:511-518.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ and d'Apice AJ. 2007. Production of homozygous α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339-344.
- Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim

- JH, Lee HT and Chang WK. 2006. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. *J. Biotech.* 122:362-371.
- 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 and Ayares DL. 2003. Production of α -1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KHS. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 40:86-90.
- Prather RS, Shen M and Dai Y. 2008. Genetically modified pigs for medicine and agriculture. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25:245-265.
- Puga YG, Schneider MK and Seebach JD. 2009. Immune responses to alpha 1,3 galactosyltransferase knockout pigs. *Current Opinion in Organ Transplantation* 14:154-160.
- Shim JH, Park MR, Yang BC, Ko YG, Oh KB, Lee JW, Woo JS, Park EW, Park SB and Hwang S. 2009. Developmental characteristics of SCNT pig embryos knocked-out of alpha-1,3-galactosyltransferase gene. *Reprod. Dev. Biol.* 33:157-162.
- Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V and Motlík J. 2005. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1049:161-171.
- Zhao J, Ross JW, Hao Y, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN and 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.

(접수: 2012. 1. 25 / 심사: 2012. 1. 27 / 채택: 2012. 2. 10)