

비외과적 수정란 이식에 의한 형질전환 소 생산 기술

엄상준¹, 양정석¹, 이수민¹, 조소영¹, 허영태², 허영남², 구분철³, 정기수⁴, 김광재⁴, 김지태⁴, 김남형², 고대환^{1*}

¹상지영서대학교 동물생명산업과, ²충북대학교 축산학과, ³대구가톨릭대학교 의학과, ⁴강원도가축위생시험소남부지소

Production of Transgenic Cattle by Non-surgical Embryo Transfer

Sang Jun Uhm¹, Jung Seok Yang¹, Su Min Lee¹, So Young Joe¹, Young-Tae Heo², Yong-Nan Xu²,
Bon Chul Koo³, Ki Soo Cheong⁴, Kwang Jae Kim⁴, Ji Tae Kim⁴, Nam-Hyung Kim², Dae-Hwan Ko^{1*}

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Sangji Youngseo College, Wonju 220-713, Korea

²Department of Animal Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

³Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

⁴South Branch of Gangwondo Veterinary Service LAB, Wonju 220-170, Korea

ABSTRACT

Recently, the transgenic animal production technique is very important for the production of bio-pharmaceutical as animal bio-reactor system. However, the absence of survival evaluation *in vitro* produced transgenic embryos has been a problem of the low productivity of transgenic animal because of absent of pre-estimate of pregnancy after transgenic embryos transferred into recipient. Therefore, this study is conducted to improve efficiency of transgenic cattle production by improving the non-surgical embryo transfer (ET) method. Transgenic bovine embryos were produced by injection of feline immunodeficiency virus enhanced green fluorescent protein (FIV-EGFP) lentiviral vector into perivitelline space of *in vitro* matured MII stage oocytes, and then *in vitro* fertilization (IVF) was occurred. Normal IVF and EGFP expressing blastocysts were transferred into recipients. Results indicated that 2 expanded blastocysts (34.7%) transferred group showed significantly ($P<0.05$) higher pregnancy rate than 1 expanded blastocyst (26.8%) transferred group. In case of parity of recipient, ET to heifer (34.9%) showed significantly ($P<0.05$) higher pregnancy rate than ET to multiparous recipient (21.2%). However, there are no significant differences of pregnancy rate between natural induced estrus and artificial induced estrus groups. Significantly ($P<0.05$) higher pregnancy rate was obtained from recipient group which have normal corpus luteum with crown group (34.8%) than normal corpus luteum without crown (13.6%). Additionally, treatment of 100 μ g Gn-RH injection to recipient group (38.6%) 1 day before ET significantly ($P<0.05$) increase pregnancy rate than non- Gn-RH injection to recipient group (38.6%). We also transferred 2 EGFP expressing expanded blastocysts to each 19 recipients, 7 recipients were pregnant and finally 5 EGFP transgenic cattle were produced under described ET condition. Therefore, our result suggested that transfer of 2 good-quality expanded blastocysts to 100 μ g of Gn-RH injected recipient which have normal corpus luteum with crown is feasible to produce transgenic cattle.

(Key words : embryo transfer, expand blastocyst, pregnancy, EGFP, transgenic cattle)

서 론

형질전환 동물은 인위적으로 외래 유전자의 도입 내지 재조합 유전자의 발현을 억제하여 본래의 유전형질이 변화된 동물이다. 이러한 형질전환 동물은 세계적으로 가축의 생산성 증대 및 기초 발생 연구뿐만 아니라, 최근 바이오 시장에서 가축을 생체 반응기로 이용한 바이오 신약 생산 분야에서도

주목을 받고 있다. 특히 젖소는 평균 착유 기간이 300일 경우, 연간 산유량이 6,000~9,000 리터이며, 리터당 40 그램의 단백질을 생산할 수 있다. 따라서 형질전환 동물 생산 기법을 이용하여 젖소를 생체 반응기로 이용한다면, 외래 유전자의 유전 조직 특이적인 발현 유도로 고가의 바이오 신약 단백질을 대량으로 생산할 수 있다.

Palmiter 등(1982)에 의해서 세계 최초로 hGH 유전자가 도

* 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ009587, PJ009046, PJ00908001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : dhko@sy.ac.kr

입된 거대 생쥐 생산된 이후 다양한 형질전환 동물 생산기술들이 개발되고 있으나, 기존의 효율을 비약적으로 높이지 못하고 있는 실정이다. 광범위하게 사용되는 형질전환 동물 생산 방법인 수정란에 외래 유전자를 미세 주입하는 기술의 경우에는 극심한 모자익시증 현상으로 1~5%로 낮은 생산효율을 가지고 있으며(Wall, 1996), 이를 보완하기 위한 Schnieke 등(1997)에 의하여 개발된 체세포 복제 기술 기반의 형질전환 동물 생산 기술도 저조한 배발생, 리프로그래밍의 불안정으로 인한 유산 및 기형의 증가 등의 문제점이 제기되고 있다(Ride-out 등, 2001; Jaenisch, 2002). 또한, 이외의 여러 기술들도 아직 완전하지 않고 성공률이 저조하여 많은 연구가 필요한 실정이며, 이를 극복할 수 있는 획기적인 형질전환 기법 기술의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 최근 viral vector system이 사용되고 있으며, 이를 이용하여 생쥐, 닭, 돼지, 소에 이르기까지 다양한 형질전환 동물들이 생산되었다(Jaenisch, 1976; Kim 등, 1993; Chan 등, 1998; Cabot 등, 2001; Koo 등, 2012). 특히 retroviral vector의 주입에 의하여 생산된 형질전환 배아에서는 모자익시증 현상 거의 없이 나타나는 것으로 보고되었다(Xu 등, 2013). 그러나 retroviral vector system을 이용한 형질전환 소의 개발 연구는 아직도 미미한 실정이다.

수정란 이식에 의한 산자 생산의 성공은 여러 가지 요인들이 수태율에 영향을 미친다. Choe 등(2010)은 수태율에 미치는 영향으로 수정란의 품질, 수정란 이식사의 숙련도 및 수란우의 상태 등 크게 3가지 원인을 지적하고 있다. 특히, 형질전환 동물의 생산에 있어서 수란우에 이식될 형질전환 수정란의 생존성을 정확히 평가할 수 있는 기준의 부재로 인해 체내 수태율을 예측할 수 없으며, 형질전환 배아의 체외 및 체내에 있어서 생존율을 향상시킬 수 있는 배양 기술의 부재 등이 원인이 되어, 형질전환 동물 생산에 있어서 착상의 실패, 유산, 조산, 사산 및 난산과 출생 후의 높은 폐사율 등을 야기한다. 이러한 문제점들로 인하여 형질전환 동물 생산효율은 매우 낮은 실정이다. 이를 극복하기 위해서는 무엇보다 기존의 형질전환 배아의 생산 기법의 개선 및 새로운 기술 개발이 필요하며, 수태율과 산자 생산을 증진할 수 있는 형질전환 수정란의 체외 및 체내에 있어서 생존율을 향상 기술이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 비외과적 수정란 이식 기술의 개선을 통한 형질전환 소 생산효율의 증진 방법을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 소 미성숙 난자의 회수 및 체외 성숙 유도

소 미성숙 난자들은 도축된 한우의 2~6 mm 크기의 가시

난포만을 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난포액을 흡인 후 15 ml 원심 분리관에 분주하고 10분간 정치시켰다. 이후 원심 분리관 하단의 침전물을 채취하여 TL-HEPES 배양액을 첨가 후 실험현미경 하에서 난자의 세포질이 균일하고, 난구세포가 치밀한 미성숙 난포란만을 회수하여 실험에 공시하였다. 이렇게 회수된 미성숙 난포란은 TCM-199 배양액(Gibco, Grand Island, USA)에 10% FBS, 5 µg/ml Folltropin, 1 µg/ml estradiol 17-β가 첨가된 50 µl 체외성숙용 배양액에 10개씩 투입하여 5% CO₂ 체외 배양기에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2. Lentiviral Vector 생산

형질전환 수정란의 생산을 위하여 사용한 lentiviral vector인 FIV-EGFP는 Feline immunodeficiency virus(FIV)에 근간을 둔 것으로, FIV-EGFP는 pCDF1-MCS2-EF1-Puro(System Biosciences, USA) vector에 EGFP 표지 유전자(Clontech, USA)와 외래 유전자 발현을 증가시키기 위한 인자인 woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element(WPRE) 서열을 도입하여 구축하였다. 고농도의 virus stock을 생산하는 방법은 다음과 같다. Calcium phosphate 방법으로 293FT 세포에 각각의 expression vector와 packaging vector들을 co-transfection시켜서 virus를 생산 후 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor(Beckman 70Ti, USA)를 이용한 초원심 분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 이후 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재 부유하였으며, 이렇게 생산된 농축된 virus stock은 0.45 µm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다.

3. 난자 위란강에 Lentiviral Vector의 미세 주입

EGFP 발현 형질전환 수정란을 생산하기 위해서는 FIV-EGFP vector를 미성숙 난자의 체외 성숙 후 18시간째에 난구세포를 제거한 후 미세 조작기를 이용하여 FIV-EGFP vector를 각각의 난자의 위란강 내로 5~10 pl씩 주입하였다. 이렇게 FIV-EGFP vector가 주입된 난자는 배양기에서 추가로 24시간까지 체외 성숙을 유도한 후 체외 수정을 유도하였다.

4. 소 성숙 난자 체외 수정 및 배발달

체외 성숙란의 체외 수정을 위하여 정자는 동결 정액을 사용하였으며, 정자 처리는 동결 정액을 용해 후 BO 배양액으로 세척한 후, 체외 성숙된 난자가 침지가 되어 있는 Fert-TALP 배양액에서 처리된 정자를 1×10⁶/ml 농도로 주입 후 18시간 동안 공배양함으로써 체외수정을 유도하였다. 이렇게 생산된 체외 수정란은 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa의 배양액으

로 72시간 동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하였으며, 이후 10% FBS가 첨가된 CR1aa 에서 4일간 배양함으로써 배반포로의 발달을 유도하였다.

5. 배반포의 수란우에 이식

일반 체외 수정과 형질전환 수정란 유래의 확장 배반포들은 이식을 위하여 0.25 ml straw에 보존용 배양액과 함께 수정란을 흡인 후 cassou gun(FHK, Tokyo, Japan)에 장착하였다. 이후 특별히 제조된 vinyl cap을 씌워서 질 내 세균의 자궁 내 오염을 방지하였으며, 젓소 수란우의 자궁경 입구에서 vinyl cap을 뒤로 당겨 제거한 후 자궁경을 통하여 황체가 존재하는 자궁각 위치에 수정란을 주입하였다. 이때 발정발현 시간 및 수정란의 주입 부위를 자궁각의 기저부와 선단을 구분하여 개체별로 기록하였다.

6. 통계 분석

실험 결과의 처리군 간의 유의성 검정을 위한 통계처리를 위해서는 SAS program의 Chi-square를 실시하였으며, 유의성은 $P<0.05$ 이하만을 인정하였다.

결 과

1. 수란우의 요인에 따른 임신율 조사

이식되는 배반포 수에 따른 임신율은 Table 1에서 보는 바와 같이 체외수정란 유래의 확장 배반포를 수란우에 2개씩 이식하였을 때 34.7%로 1개씩 이식하였을 때의 26.8%보다 유의적으로 높았다($P<0.05$). 이 결과를 바탕으로 차후 실험은 수란우에 확장 배반포를 2개씩 이식하였으며, Table 2는 배반포 이식시 수란우의 산차에 따른 임신율을 조사하였다. 그 결과, 수란우가 미경산우일 경우 임신율이 34.9%로 경산우의 21.2%에 비하여 유의하게 높았다($P<0.05$). 한편, 수란우로써 미경산우에 자연 발정과 발정 유도에 따른 배반포란의 이식 후 임신율을 조사한 결과에 있어서는 PG투여에 의한 발정 유도(35.2%)의 경우가 자연 발정(33.1%)보다 임신율이 높았으나, 유의차는 보이지 않았다 (Table 3). 또한 비외과적 수정란에 이식 시 미경산우와 경산우를 나누어 확장 배반포를 이식하였을 경우, 미경산우에 이식을 하였을 경우에 유의적으로 ($p<0.05$) 높은 임신율을 보였다.

이러한 수란우 조건하에서 수란우의 황체 상태에 따른 임신율을 조사하였다. 황체 상태에 따라 황체가 정상이고, crown이 있는 경우를 A군, 황체가 정상보다 작은 15 mm이하이면서 crown이 있는 경우를 B군, 그리고 황체 크기는 정상이나 crown이 없는 것을 C군으로 분류하여 확장 배반포를 이식하였다. 그 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 A군은 34.8%, B군은 32.9%로써 임신율의 차이는 없었지만, C군의 경우 13.6%

로써 A와 B군보다 유의하게 낮았다($P<0.05$). 또한 수란우에 Gn-RH 투여 여부에 따른 임신율을 조사하였으며(Table 5), 확장 배반포 이식 시 수란우에 100 μ g의 Gn-RH를 이식 전날(발정 7일째) 근육 주사한 경우가 임신율이 38.6%로써 주사하지 않은 군의 31.2%보다 유의하게 높게 나타났다($P<0.05$).

Table 1. Pregnancy rates by number of blastocysts transferred into Hanwoo recipients

No. of blastocysts embryo transferred	No. of total blastocysts	No.(%) of pregnancy
One	56	15(26.8) ^a
Two	351	122(34.7) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P<0.05$).

Table 2. Pregnancy rates by parity of Hanwoo recipients

Species of recipients	No. of total blastocysts	No.(%) of pregnancy
Heifer	352	123(34.9) ^a
Multiparous recipient	85	18(21.2) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P<0.05$).

Table 3. Pregnancy rates by method of estrus of corpus luteum of Hanwoo recipients

Estrus	No. of total blastocysts	No.(%) of pregnancy
Natural estrus	293	97(33.1)
Estrus induction*	122	43(35.2)

* Estrus induction by PG

Table 4. Pregnancy rates by condition of corpus luteum of Hanwoo recipients

Condition of corpus luteum	No. of total blastocysts	No.(%) of pregnancy
A	152	53(34.8)a
B	176	58(32.9)a
C	95	13(13.6)b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P<0.05$).

Table 5. Pregnancy rates by Gn-RH medication before blastocysts transferred into Hanwoo recipients

Gn-RH medication	No. of total blastocysts	No.(%) of pregnancy
Non-treatment	88	34(38.6) ^a
Treatment	359	112(31.2) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed ($P<0.05$).

2. 형질전환 난자 이식 및 산자 생산

형질전환 난자는 lentiviral vector인 FIV-EGFP vector를 체외 성숙된 난자의 위란강에 주입과 체외수정 후 체외 배양에 있어서, FIV-EGFP vector 주입군의 경우 대조군에 비하여 분할률에서는 차이가 없었지만, 배반포로의 발달과 부화율에 있어서는 대조군에 비교하여 저조하였으며, 주입군의 경우 44.7%의 배반포에서 EGFP의 발현을 확인하였다(Table 6과 Fig. 1-A). 이들 EGFP의 발현이 확인된 확장 배반포는 EGFP 형질전환 산자 생산을 위하여 본 연구에서 개발된 수정란 이식 조건하에 19두의 수란우에 EGFP의 발현이 확인된 확장배반포를 2개씩 이식하였으며(Table 7), 수란우에서 임신 유무를 감정한 결과, 모두 7마리가 임신하였다(Fig. 1-B). 이 중 2마리는 유산되었지만 5마리(수컷 1두, 암컷 4두)의 EGFP 발현 형질전환 송아지를 생산하였다(Table 7). 이렇게 생산된 형질전환 송아지에서의 EGFP의 발현을 조사한 결과, Fig. 1-C에서 보는 바와 같이 외관에서 눈, 코, 입 및 발굽에서 EGFP 발현이 확인되었으며, 이들 송아지 중 한 마리를 해부하여 장기 내의 EGFP 발현을 확인한 결과, 모든 조직과 장기에서

EGFP 발현을 확인하였다.

고찰

본 연구는 비외과적 수정란 이식 방법을 개선하여 형질전환 소 생산 효율을 높이기 위하여 실시되었다. 이전의 비외과적 수정란 이식의 보고에 의하면 수란우에 1개의 수정란을 이식을 하였을 때보다는 2개의 배반포를 이식하였을 경우에 임신율의 향상을 보였으며(Betteridge 등, 1980; Heyman, 1985), 본 연구의 결과에서도 Table 1에서 보는 바와 같이 2개의 확장 배반포를 수란우에 이식을 하였을 때 유의하게 높은 임신율을 보였다($P<0.05$). 그러나 Kim 등(1998)의 보고에 의하면 비외과적 수정란이식에 있어서 수란우에 1개 혹은 2개의 배반포를 이식을 하였을 때 커다란 차이는 보이지 않았으며, 이식된 난자 수보다는 난자의 질이 임신율에 더 큰 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구에서는 양질의 확장 배반포를 꾸준히 생산하여 이식하였기 때문에, 1개보다는 2개의 확장 배반포를 이식을 하였을 경우 유의적으로($P<0.05$) 높은 임신율을 보인 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 비외과적 수정란에 이식 시 미경산우와 경산우를 나누어 확장 배반포를 이식하였을 경우 미경산우에 이식을 하였을 경우에 유의적으로($P<0.05$) 높은 임신율을 보였는데, 이러한 결과는 Elsdén 등(1982)이 보고한 미경산우가 경산우보다 임신율이 좋다는 결과와 유사하다. 그러나 Kim 등(1998)의 보고에 의하면 미경산우보다는 산차가 높은 경산우에서 높은 임신율을 보였으며, Wright(1981)는 미경산우와 경산우 사이에 수정란 이식 시 차이가 없다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 수란우를 젖소를 사용을 하였으며, 경산우의 경우 착유소이기 때문에 많은 비

Table 6. EGFP expression and developmental rates after injection and IVF of FIV-EGFP vector into oocytes perivitelline space

Treatment	No. of oocytes	No.(%) of embryos cleaved	No.(%) of blastocysts	No.(%) of blastocysts hatched	No.(%) of EGFP expressed
Control	424	311(73.6)	119(28.8) ^a	80(19.3) ^a	0(0) ^a
Injection	401	280(70.1)	74(18.5) ^b	49(12.2) ^b	178(44.7) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed ($P<0.05$).

Table 7. Production of offspring after transfer into Hanwoo recipients of normal IVF embryos and EGFP expressing embryos

Species of blastocysts	No. of recipients	No.(%) of pregnancy	No.(%) of abortion	No.(%) of parturition	No. of EGFP expression
Normal IVF embryos	146	60(41.1) ^a	7(4.8) ^a	53(36.3) ^a	0(0) ^a
EGFP expressing embryos	19	7(36.8) ^b	2(10.5) ^b	5(26.3) ^b	5(100) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P<0.05$).

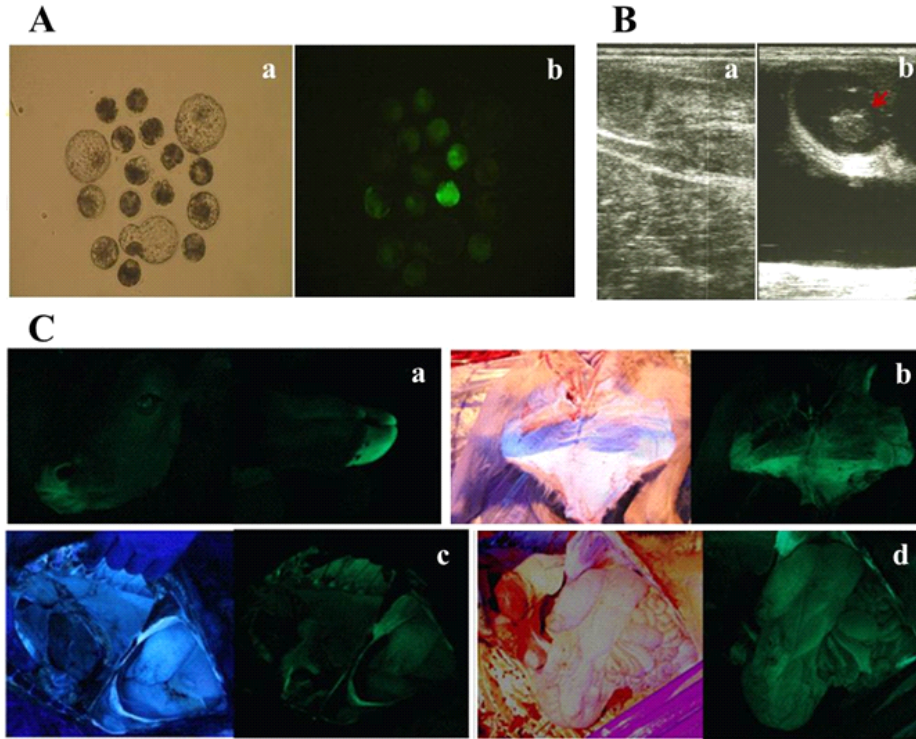


Fig. 1. Production of EGFP expressing bovine. A : Production of blastocysts(a) and EGFP expression(b) after injection and IVF of FIV-EGFP vector into oocytes perivitelline space. B : Ultrasonic pictures at 2 month after EGFP expressing blastocysts embryo transferred into recipients(a : not pregnancy, b : pregnancy-arrow). C : EGFP expression(a : eye, nose, mouse and hoof, b : muscle, c : rib and midriff, d : all organs) in offspring.

유에 따른 번식 억제로 인하여 경산우보다는 미경산우를 수란우로 사용하였을 경우가 유의하게($P < 0.05$) 높은 임신율을 보인 것으로 사료된다.

이러한 수란우 조건하에서 수란우의 황체상태에 따른 임신율을 조사하였다. 최근 Choe 등(2011)은 한우 수정란의 이식 시 수란우의 황체의 등급에 따라서 임신율에 커다란 영향을 미친다고 보고하고 있으며, 이전의 Kim 등(1998)의 보고에서도 황체의 등급이 임신율에 영향을 미친다고 보고하고 있다. 그러나 Oh 등(2001)은 수정란의 이식 시 수란우의 황체상태는 임신율에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 비록 황체의 상태가 임신율에 미치는 영향에 대하여는 다양한 의견이 있으나, 본 연구에서는 Choe 등(2011)의 보고와 같이 황체의 등급에 따라서 임신율에 영향을 미쳤으며, 이러한 결과는 황체의 크기가 클수록 황체에서 임신 호르몬인 progesterone의 분비가 증가하여 임신에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서의 Gn-RH 투여에 따라서 임신율이 증가하는 것으로 조사되었는데, 이러한 결과 역시 Gn-RH 투여에 따른 LH 호르몬의 증가는 황체의 발달을 더욱 촉진시켜서 황체에서 임신 호르몬인 progesterone의 분비의 증가를 유도하여 임신율을 증가시킨 것으로 사료된다.

이상의 확립된 비외과적 수정란 이식방법으로 형질전환 소 생산 연구를 수행하였다. 형질전환 난자는 lentiviral vector인 FIV-EGFP vector를 체외 성숙된 난자의 위란강에 주입하여 체외배양을 하였으며(Table 6), 생산된 EGFP 발현 형질전환 배반포는 수란우에 이식을 하여 산자를 생산하였다(Table 7과 Fig. 1). 본 연구에서 사용된 lentiviral vector는 HIV-based lentiviral vector로써, 이를 이용하여 선임 연구에서 EGF 형질전환 생쥐(Lois 등, 2002), 돼지(Hofmann 등, 2003) 및 소(Hofmann 등, 2004)등의 생산을 시도하였다. 생쥐(Lois 등, 2002)와 돼지(Hofmann 등, 2003)의 경우 zygote 단계의 난자에 lentiviral vectors를 주입하여 산자를 생산하였으나, 소의 경우에는 실패하였다. 그러나 수정 직전 배아에 lentiviral vector를 주입한 후 체외 수정을 유도한 경우에는 형질전환 산자를 생산하였다(Hofmann 등, 2004). 본 연구에서도 FIV-EGFP vector를 난자의 위란강에 주입 후 체외 수정을 유도하여 EGFP 발현 형질전환 수정란을 생산하였으며, 이들 중 EGFP 발현 확장 배반포를 수란우에 이식하여 EGFP 발현 형질전환 산자를 성공적으로 성공을 하였다. 이러한 결과들은 lentiviral vector를 이용한 외래 유전자의 도입이 zygote 단계의 핵막이 존재하는 경우보다는 수정 전 MII 단계의 난자의 경우 핵막이 존

재하지 않기 때문에 lentiviral vector가 핵막이 존재하는 경우 보다는 핵막이 없는 경우에 염색체 내로의 도입이 더 용이하여 성공적으로 형질전환 산자의 생산이 가능했던 것으로 사료된다.

이상의 결과로 본 연구가 목표로 하고 있는 비외과적 수정란 이식 기술의 개선을 통하여 형질전환 소 생산을 위한 기반 기술이 확립되었으며, 추후 이러한 기반 기술을 통하여 바이오 신약을 생산할 수 있는 형질전환 소를 개발하는데 유용하게 사용이 될 것이라 사료된다.

결 론

본 연구는 비외과적 수정란 이식 방법 개선을 통한 형질전환 소 생산 효율성 증진을 위하여 실시하였다. 그 결과, 수란우에 이식되는 확장 배반포 수에 따른 임신율을 조사한 결과에 있어서는 임신율은 2개 주입한 것이 1개 주입한 것보다 유의적으로 높았다($P<0.05$). 수란우의 산차에 따른 임신율을 조사한 결과에 있어서는 미경산우가 경산우보다 유의하게 높았지만($P<0.05$), 자연 발정과 PG 투여에 의한 발정 유도에 따른 배반포란의 이식 후 임신율에 있어서는 유의적 차이가 보이지 않았다. 황체 상태에 따라 임신율을 조사하였을 경우에는 황체가 정상이고, crown이 있는 경우가 황체 크기는 정상이나, crown이 없는 것보다 유의하게 높았다($P<0.05$). 또한 배반포 이식 시 수란우에 Gn-RH 투여 여부에 따른 임신율을 조사한 결과에 있어서는 이식 전날(발정 7일째) 100 µg Gn-RH를 근육주사를 하였을 경우가 임신율이 유의하게 높았다($P<0.05$). 특히 이러한 이식조건 하에서 19두의 대리모에 각각 2개씩 EGFP 형질전환 확장 배반포를 이식하였을 경우에는 7마리가 임신과 성공적으로 5마리의 EGFP 형질전환 소가 생산되었다. 따라서 이상의 결과로 수정란 이식 시 수태율을 높이기 위해서는 2개의 질적으로 우수한 확장 배반포를 crown이 있는 황체를 가진 미경산우에 이식 전날 100µg Gn-RH 근육주사 후 이식하는 것이 형질전환 소 생산에 효율적이라 것으로 조사되었다.

참 고 문 헌

Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB and Mitchell D. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestus. J. Reprod. Fert. 59: 205-216.
Cabot RA, Kuhholzer B, Chan AW, Lai L, Park KW, Chong KY, Schatten G, Murphy CN, Abeydeera LR, Day BN and Prather RS. 2001. Transgenic pigs produced using *in vitro* matured oocytes infected with a retroviral vector. Anim. Biotechnol. 12: 205-214.

Chan AWS, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC and Bremel RD. 1998. Transgenic cattle produced by reversetranscribed gene transfer in oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14028-14033.
Choe CY, Son JK, Cho SR, Kang DW, Yeon SH, Choi SH, Choi SH, Kim NT, Kim JB, Jung YS, Kim SJ, Jung JW, Bok NH, Yoo YH and Son DS. 2010. Effects of pregnant rate after embryo transfer in oxygen consumption of embryos in Korean cattle. Korean J. Emb. Trans. 25: 145-148.
Choe CY, Son JK, Cho SR, Kang DW, Yeon SH, Choi SH, Kim NT, Jung YS, Kim SJ, Jung JW, Bok NH, Choi JS and Son DS. 2011. Effects of corpus luteum grade of estrus synchronized recipients on pregnancy rate following embryo transfer in Korean cattle. Korean J. Emb. Trans. 26: 33-36.
Heyman Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. Theriogenology 23:63-75.
Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E and Pfeifer A. 2003. Efficient transgenesis in farmanimals by lentiviral vectors. EMBO Rep. 4: 1054-1060.
Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E and Pfeifer A. 2004. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. Biol. Reprod. 71: 405-409.
Jaenisch R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260-1264.
Jaenisch R. 2002. Nuclear cloning, embryonic stem cells, and transplantation therapy. Harvey Lect. 98: 145-171.
Kim HR, Kim DI, Park NH, Kim CK, Chung YC, Yoon JT and Jeon GJ. 1998. Studied on the improvement embryo transfer efficiency in Korean cattle I. Effect of recipient conditions on pregnancy rate after embryo transfer. Korean J. Emb. Trans. 13: 61-67.
Kim HR, Kim DI, Won YS, Chung YC, Lee KS, Suh HW and Park CS. 1998. Studied on the improvement embryo transfer efficiency in Korean cattle I. Effect of embryo conditions on pregnancy rate after embryo transfer. Korean J. Emb. Trans. 13: 53-60.
Kim YJ, Park H, Lee HL, Shin DS, Jo SW, Kim YS and Kim SH. 2008. Results of embryo transfer with Hanwoo embryos produced *in-vivo* or *in-vitro* to Holstein cows as recipients. Korean J. Emb. Trans. 23: 167-175.
Kim T, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1993. Gene

- transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon ape leukemia virus envelopes. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 105-113.
- Koo BC, Kwon MS, Roh JY, Kim M, Kim JH and Kim T. 2012. Quantitative analysis of tetracycline-inducible expression of the green fluorescent protein gene in transgenic chickens. *J. Reprod. Dev.* 58: 672-677.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ and Baltimore D. 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295: 868-872.
- Oh SJ, Yang BS, Im GS, Yang BC, Seong HJ, Park YY and Kim KN. 2001. Effects of characteristics of corpus luteum and serum metabolites on pregnancy rate following embryo transfer in Hanwoo cow. *Korean J. Animal. Reprod.* 25: 9-17.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC and Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Rideout WM, Eggan K and Jaenisch R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093-1098.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133.
- Wall RJ. 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45: 57-68.
- Wright JM. 1981. Non-surgical transfer in cattle : embryorecipient interaction. *Theriogenology* 15: 43-46.
- Xu YN, Uhm SJ, Koo BC, Kwon MS, Roh JY, Yang JS, Choi HY, Heo YT, Cui XS, Yoon JH, Ko DH, Kim T and Kim NH. 2013. Production of transgenic Korean native cattle expressing enhanced green fluorescent protein using a FIV-based lentiviral vector injected into MII oocytes. *J. Genet. Genomics* 40: 37-43.

(접수: 2013. 07. 05/ 심사: 2013. 07. 08/ 채택: 2013. 08. 05)