

## 체세포 핵치환 기술을 이용한 hGCSF와 GFP 유전자 동시발현 형질전환 소 배아 생산

양정석<sup>1,2</sup> · 조소영<sup>1</sup> · 구본철<sup>3</sup> · 허영태<sup>4</sup> · 이수민<sup>1</sup> · 강만중<sup>5</sup> · 송혁<sup>4</sup> · 고대환<sup>1</sup> · 엄상준<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>상지영서대학교 동물생명산업과, <sup>2</sup>건국대학교 식품생명과학부, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 의학과, <sup>4</sup>건국대학교 동물생명공학과, <sup>5</sup>전남대학교 축산학과

### Production of hGCSF and GFP Co-Expressed Transgenic Cow Embryo by Somatic Cell Nuclear Transfer Technique

Jung Seok Yang<sup>1,2</sup>, So Young Joe<sup>1</sup>, Bon-Chul Koo<sup>3</sup>, Young-Tae Heo<sup>4</sup>, Su Min Lee<sup>1</sup>, Man-Jong Kang<sup>5</sup>, Hyuk Song<sup>4</sup>, Dae Hwan Ko<sup>1</sup> and Sang Jun Uhm<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Science and Biotechnology, Sangji Youngseo College, Wonju 26339, Korea

<sup>2</sup>Division of Food Bioscience, RIBH, College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk University, Chungju 27478, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 38430, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Animal Biotechnology, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

<sup>5</sup>Dept. of Animal Science, Chunnam National University, Gwangju 61186, Korea

#### ABSTRACT

The purpose of this study is to develop transgenic cell line expressing targeted human granulocyte colony stimulating factor (hGCSF) and green fluorescence protein (GFP) genes as well as production of Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) embryos derived from co-expressed transgenic donor cells. Constructed pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector was chemically transfected into bovine fetus cells and then, only GFP expressed cells were selected as donor cells for SCNT. Cleavage and blastocyst rates of parthenogenetic, SCNT embryos using non-TG cell and hGCSF-GFP dual expressed SCNT embryos were examined (cleavage rate: 78.0±2.8 vs. 73.1±3.2 vs. 70.4±4.3%, developmental rate: 27.2±3.2 vs. 21.9±3.1 vs. 17.0±2.9%). Result indicated that cleavage and blastocyst rates of TG embryos were significantly lower ( $P<0.05$ ) than those of parthenogenetic and non-TG embryos, respectively. In this study, we successfully produced hGCSF-GFP dual expressed SCNT embryos and cryopreserved to produce transgenic cattle for bioreactor system purpose. Further process of our research will transfer of transgenic embryos to recipients and production of hGCSF secreting cattle.

(Key words: SCNT, hGCSF, GFP, transgenic embryo, cow)

#### 서론

체세포 복제기술은 생명공학 기반 연구에 전반적인 영향을 주며, 유용단백질 생산용 생체반응기 제작 목적의 형질전환동물 생산(Cibelli 등, 1998), 희귀동물의 보존(Mastromonaco와 King, 2007) 및 질환동물 생산(Lee 등, 2014) 등 여러 분야에 이용이 되고 있다. 특히, 대량의 유즙을 분비하는 형질전환 젖소를 이용한 바이오 신약 단백질 생산은 오랜 기간 동안 많은 연구자들에 의하여 시도되었다. 그러나 목적단백질의 저조한 발현, 기술적 한계로 인한 낮은 산자 생산효율 등의 문제들이 제기

되고 있다(Miao, 2013). 또한, 항생제 내성 유전자를 공여세포에 도입하였을 경우, 지속적인 항생제 처리에 의한 세포의 거대화 내지는 비정상화 등의 체세포 손상으로 인하여 실질적인 정상 산자의 생산이 어려운 실정이다(Rideout 등, 2001; Jaenisch, 2002). 최근, 이러한 문제들을 극복하고 형질전환 젖소를 생산하기 위하여 항산화제를 이용한 형질전환 수정란 생산 효율 향상(Choe 등, 2010), 내분비 조절 기술 개발(Choe 등, 2011), 바이럴 벡터를 이용한 외래유전자 도입효율 향상(Hofmann 등, 2003, 2004), 대리모의 선별(Kim 등, 2008) 등의 기술들을 시도 중이다. 그러나 이러한 시도 이외에도 외래유전자가 도입된 공

\* 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ01117603)의 지원에 의해 이루어진 것임.

\* Correspondence : sjuhm@sy.ac.kr

여핵의 정확한 선별 시스템의 구축은 형질전환 복제동물 생산 효율 향상에 필수불가결한 요인이다. 따라서 본 연구에서는 체세포 복제기술을 이용하여 목적 유전자인 human granulocyte colony stimulating factor(hGCSF)와 선별 유전자인 green fluorescence protein(GFP) 유전자가 공동 발현하는 형질전환 소를 개발하고자, hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 체세포 복제수정란의 배반포기까지의 체외 배발달 효율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 소 미성숙난자의 회수 및 체외성숙 유도

도축된 한우의 난소에서 2~6 mm 크기의 가시난포 만을 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 난포액을 흡인하여 소 미성숙난자들을 회수하였으며, 15 ml 원심분리관에 분주하고 10분간 정지시켰다. 이후, 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TL-HEPES 배양액을 첨가한 후, 실체현미경 하에서 세포질이 균일하고 난구세포가 치밀한 미성숙난포란 만을 회수하여 실험에 공시하였다. 회수된 미성숙난포란은 TCM-199 배양액(Gibco, Grand Island, USA)에 10% FBS, 5 µg/ml Folltropin, 1 µg/ml estradiol 17-β가 첨가된 50 µl의 체외성숙용 미세세포적에 10개씩 투입하여 5% CO<sub>2</sub> 체외 배양기에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

### 2. 공여세포 준비

공여세포는 젖소의 암컷태아로부터 체세포를 떼어내어 0.9% 생리식염수에서 세척한 다음 PBS를 이용하여 2차례 추가 세척하였다. 조직을 약 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 세절하였다. 이 조각들을 PBS에서 부유시킨 후 10% FBS, penicillin(100 IU/ml)/streptomycin(100 µg/ml) 그리고 1.5 g/L sodium bicarbonate가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액이 담긴 60φ petri dish에 부착시킨 후 5% CO<sub>2</sub>세포 배양기에서 배양하였다. 일주일간 primary culture가 된 세포는 dish에서 떼어낸 후 계대배양을 하여 공여세포로 이용하였다.

### 3. 유선조직 특이적인 hGCSF 유전자 발현을 위한 Vector의 구축

hGCSF 유전자의 유선조직 특이적인 발현을 위하여 mouse WAP promoter를 도입한 piggyBac transposon vector인 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector를 구축하였다. 먼저 PB-CMV-MCS-EF1-GFP vector(System Biosciences, USA)의 CMV promoter 부분을 제거한 후 pGEM-7Zf-mWAP vector에서 분리해낸 2.4 Kb 크기의 WAP promoter를 도입하였으며, 이를 pPiggy-X-EF1-GFP라고 명명하였다. 다음 단계로 pGEM-11Zf-hGCSF vector에서 분리한 hGCSF 단편을 pPiggy-X-EF1-GFP vector의 WAP promoter의 3' 위치에 도입하여 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector를 재조합하였으며, 본 vector의 구조는 아래의 Fig. 1과 같다.

### 4. Vector 구축

전 단계에서 구축된 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector를 소 태아세포에 도입하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 1~2 passage의 BFF 세포는 하루 전에 60 mm 직경의 culture dish에 1×10<sup>6</sup>개로 seeding하였다. 다음 날 4:1 비율의 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP와 Super PiggyBac Transposase e-expression vector(System Biosciences, USA)를 lipofectamine reagent(Invitrogen, USA)와 혼합하여 실온에 30분간 방치한 다음, 준비한 세포에 transfection하였다. 이후 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 교환하여 48시간 이상 배양한 후 RT-PCR과 형광현미경 관찰 방법으로 hGCSF와 GFP 유전자의 발현 여부를 확인하였다.

### 5. 소 성숙난자의 체세포 복제

체외 성숙된 난자를 0.1%의 hyaluronidase가 포함된 PBS에서 난구세포를 제거한 후, 1% BSA가 포함된 PBS로 3회 세정하였다. 이 난자는 7.5 µg/ml의 cytochalasin B와 1% BSA가 첨가된 PBS에서 30 µm의 pipette을 이용하여 제 1극체와 그 주위의 세포질을 약 30% 가량 흡입함으로써 난자 내의 핵을 제

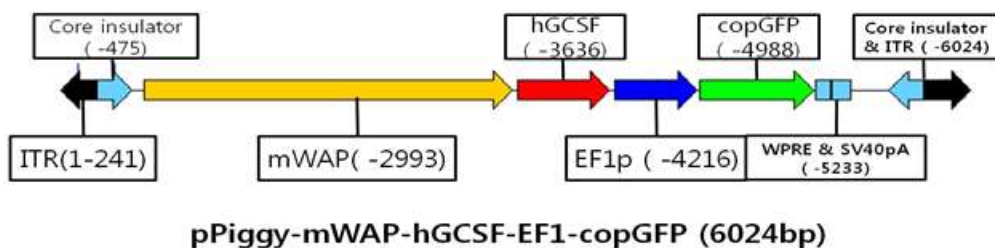


Fig. 1. pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-copGFP vector for G-CSF gene introduction into bovine fetal fibroblast. ITR: inverted terminal repeat sequence, Ins: core insulator, mWAP: mouse whey acidic protein promoter, hG-CSF: human granulocyte-colony stimulating factor gene, EF1p: elongation factor-1 alpha promoter, EGFP: enhanced green fluorescent protein gene, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, pA: poly A signal.

거하였다. 핵이 제거된 난자는 Hoechst 33342로 염색하여 핵의 제거 여부를 확인한 후, 제핵된 난자 만을 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa에서 약 1시간 동안 배양하였다. 핵치환을 위해 제핵된 난자에 계대 배양한 소의 태아세포를 위관강 내에 주입하였다. 난자와 체세포의 융합은 융합 배양액(0.3 M manitol, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>) 내에서 0.5 mm platinum electrode chamber로 2.63 kV/cm, 30 μsec, 2 pulse로 전기 자극으로 핵 융합을 실시하였다. 세포의 융합이 이루어진 난자는 난자의 발달을 유도하기 위하여 난활성을 유도하였다.

#### 6. 소 복제수정란의 난활성 및 체외배양

일반과 형질전환 복제수정란의 난활성은 세포융합된 난자를 5.0 μM Calcium ionophore A23187(Sigma)에 5 min 동안 처리하여 세포 융합된 세포질 내에 calcium 자극을 일으켜 난활성을 유도한 후, 2.0 mM의 6-DMAP에서 4시간 동안 처리하여 완전한 난활성을 유도하였다. 난활성이 유도된 일반과 형질전환 복제수정란 및 단위발생란은 0.3% BSA가 첨가된 CR I aa의 배양액으로 48시간 동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하여 10% FBS가 첨가된 CR I aa에서 배아발생의 증진을 위하여 소 난관 상피세포와 공배양하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 체외발달을 유도시켰다. 이렇게 체외발달이 유도된 일반과 형질전환 복제수정란 및 단위발생란은 난활성 후 7일째에 배반포로의 발달을 조사하였다.

#### 7. 형질전환 복제수정란의 RT-PCR 분석

pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP 벡터가 도입된 소 태아세포를 이용한 체세포 복제 유래의 배반포 내 hGCSF와 GFP 유전자의 발현을 확인하기 위해서는 난자의 투명대를 제거한 후 PT-PCR tube에 난자를 넣은 후 10 pmol의 각 primer와 10 μl의 2X GoTaq® Green Master Mix(Promega, USA)와 혼합하여 최종 반응 용액의 부피를 20 μl로 맞추고 94°C에서 5분간 초기 반응을 실시한 후, 본격적인 PCR 증폭을 35회 실시하였다. 증폭 반응은 94°C에서 30초(변성), 56°C에서 30초(primer 부착), 그리고 72°C에서 30초(신장)의 3단계로 이루어졌다. 35회의 증폭반응 후, 72°C에서 7 분간 최종 신장 반응을 실시하였다. 또한 이때 사용한 primer는 Table 1과 같다.

#### 8. 통계분석

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

## 결 과

개발된 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP 벡터(Fig. 1)가 도입된 hGCSF-GFP 유전자 발현 소 태아세포(Fig. 2)를 이용하여 체세포 복제를 통한 형질전환 난자는 일반 소 태아세포를 이용한 체세포 복제수정란과 단위발생란의 분할율 및 발달율과 비교하여 조사하였다(Table 2). 그 결과, 분할률에 있어서 hGCSF-GFP 유전자 발현 체세포 복제수정란은 70.4±4.3%로 일반 체세포 복제수정란의 73.1±3.2%와 유사하였지만, 단위발생란의 78.0±2.8%에 비교하여 hGCSF-GFP 유전자 발현과 일반 체세포 복제수정란 모두 유의적으로( $P < 0.05$ ) 낮았다. 또한 배반포로의 발달에 있어서도 hGCSF-GFP 유전자 발현 체세포 복제수정란은 17.0±2.9%로써, 일반 체세포 복제수정란의 21.9±3.1%보다 유의적으로( $P < 0.05$ ) 낮았으며, 단위발생란의 27.2±3.2에 비교하여 이발 체세포 복제수정란 역시 유의적으로( $P < 0.05$ ) 낮았다. 하지만 hGCSF-GFP 유전자 발현 체세포 복제수정란이 단위발생란과 일반 체세포 복제수정란에 비교하여 배반포로의 발달율이 저조하였지만, 성공적으로 이식 가능한 GFP 발현 배반포를 생산하였다(Fig. 2). 또한 Fig. 3에서 보는 바와 같이, hGCSF-GFP 유전자가 도입된 소 태아세포를 이용하여 생산된 체세포 복제수정란에서 RT-PCR에 의해서 hGCSF와 GFP 유전자 발현이 모두 확인이 되었다.

## 고 찰

GFP는 형질전환 동물 생산에 있어 효과적인 표지인자로서 사용되어지고 있기 때문에(Koo 등, 2012), 본 연구에서는 표지 유전자인 GFP와 목적유전자인 hGCSF가 공동 발현하는 체세포를 개발하였으며, GFP 유전자의 발현 여부에 따라 유전자가 도입된 체세포를 선별하고, 이들 체세포는 체세포 복제기술을 이용하여 hGCSF-GFP 유전자가 공동 발현하는 이식 가

Table 1. Primers used for RT-PCR analyses

Gene	Sequence	Product size (bp)
hGCSF	5'-AGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGC-3' (+) 5'-GTACGACACCTCCAGGAAGCTCTG-3' (-)	398
copGFP	5'-ACAGCGTGATCTTCACCGACAAG-3' (+) 5'-GGTCTTGAAGGCGTGCTGGTACT-3' (-)	281

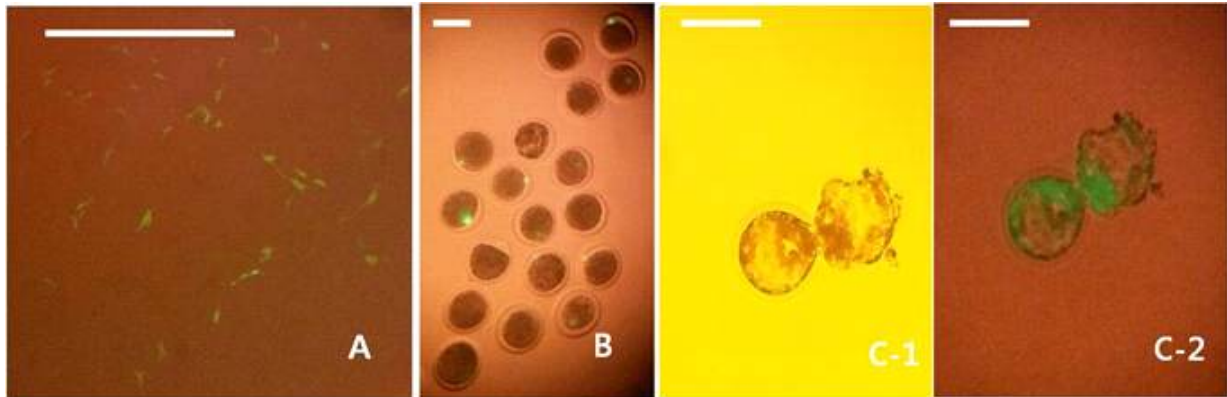


Fig. 2. Production of co-expression transgenic cow embryos by G-CSF and EGFP. A: GFP expressed in pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector induced into cow fetal fibroblast, B: pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector induced into cow fetal fibroblast injected into perivitelline space of enucleated oocytes, C: GFP expressed in blastocyst (Scale bar indicates 100  $\mu$ m).

Table 2. Development of co-expression transgenic cow embryos by G-CSF and EGFP

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocyst
Parthenote	379	295(78.0 $\pm$ 2.8) <sup>a</sup>	80(27.2 $\pm$ 3.2) <sup>a</sup>
SCNT	346	253(73.1 $\pm$ 3.2) <sup>b</sup>	55(21.9 $\pm$ 3.1) <sup>b</sup>
hGCSF-GFP SCNT	334	234(70.4 $\pm$ 4.3) <sup>b</sup>	41(17.0 $\pm$ 2.9) <sup>c</sup>

Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>) within column differ significantly ( $P < 0.05$ ).



Fig. 3. RT-PCR in co-expression transgenic cow embryos by G-CSF and EGFP (L: 500 Leader, P: pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector induced into cow fetal fibroblast, N: normal cow fetal fibroblast, 1~5: blastocysts derived from embryos nuclear transferred by pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP vector induced into cow fetal fibroblast).

능한 형질전환난자를 생산하고자 실시하였다. 이미 이를 위하여 개발된 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP 벡터는 소 태아세포에 도입하였으며, 유전자 도입 후 GFP 유전자 발현을 통하여 유전자 발현 유무와 선별을 하였다. 이들 GFP 유전자 발현 체세포는 체외성숙된 소 성숙난자를 이용하여 체세포 복제기술을 통하여 hGCSF-GFP 유전자가 공동 발현하는 형질전환난자를 생산하였다. 비록, 여러 선행연구에서 hGCSF를 형질전환 동물에서 생산하기 위한 다양한 시도(Samoilov 등, 2013; Batista 등, 2014)들이 있었으나, 낮은 산자 생산효율과 미비한 발현량 등의 문제가 있었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 표지 유전자와 목적유전자의 동시발현 형질전환 동물의 생산

(Krestel 등 2004) 또한 시도되었으나, 아직까지 실용화되기에는 극복되어야 할 문제들이 있다. 이러한 문제점들을 해결하고자 본 연구진이 최근 형광 형질전환 한우 생산에 사용한 렌티 바이러스 벡터의 기본 골격을 이용하여(Xu 등, 2013) 개발된 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP 벡터(Fig. 1)를 소 태아세포에 도입하여 GFP 유전자가 발현하는 소 태아세포(Fig. 2. A)를 생산하였다. 이렇게 GFP 유전자가 발현하는 소 태아세포는 다른 처리 없이 GFP 유전자가 발현하는 소 태아세포 세포만을 미세조작기 하에서 선택하여 제핵된 성숙난자의 위란강 내로 주입을 한 후 전기융합을 통하여 형질전환 복제수정란을 생산하였다(Fig. 2. B와 C). 이전의 연구에서 많은 연구자들은 세포에 도입하고 있는 목적 유전자 벡터에 neo 저항성 유전자를 삽입하여 세포에 유전자를 도입 후 G418 항생제 처리로 목적 유전자가 도입된 세포만을 선별을 하였다(Uhm 등, 2000; Cho 등, 2007). 그러나 이러한 방법을 사용하였을 경우, 지속적인 항생제는 세포주기 중 DNA repair 과정을 방해하여 핵은 분열하지 못하며, 세포질만 커지는 세포거대화를 야기하거나, 다양한 종류의 세포 손상을 유도하기 때문에(Doll과 Weiss, 1983; Steinberg 등, 1980), 100% 목적 유전자만이 도입된 세포만을 선별하는데 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 목적 유전자의 세포내 도입 후 선별을 위하여 marker 유전자인 GFP

유전자를 벡터에 삽입 후, GFP 유전자의 발현을 통하여 목적 유전자인 hGCSF가 도입된 체세포만을 선별하였는데, 이러한 경우는 다른 처리가 필요하지 않아 세포의 손상이 없는 hGCSF만이 도입된 체세포 복제용 공여세포를 얻을 수 있었다.

이렇게 생산된 hGCSF-GFP 발현 체세포를 이용하여 체세포 복제를 이용한 형질전환 소 복제수정란을 Table 2에서 보는 바와 같이 생산하였다. 그 경우에 있어서 hGCSF-GFP 발현 형질전환 소 복제수정란의 분할율과 배반포의 발달율에 있어서 일반 소 태아세포를 이용한 체세포 복제수정란과 분할율에서는 차이가 없었지만, 배반포로의 발달에 있어서는 일반 소 태아세포를 이용한 체세포 복제수정란에 비교하여 현저하게( $P<0.05$ ) 낮았다. 또한 hGCSF-GFP 발현 형질전환 소 복제수정란과 일반 소 태아세포를 이용한 체세포 복제수정란의 분할율과 배반포의 발달율에 모두 있어서 단위발생란보다는 현저하게( $P<0.05$ ) 낮았다. 하지만 성공적으로 이식 가능한 GFP 발현 배반포를 생산하였다(Fig. 2. C). 무엇보다 RT-PCR에 의해서 생산된 형질전환 소 난자에서 hGCSF와 GFP 유전자 발현이 모두 확인이 되었다(Fig. 3).

이상의 결과로 본 연구가 목표로 하고 있는 체세포 복제 기술을 이용하여 hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 체세포 복제수정란을 성공적으로 생산을 하였으며, 또한 체세포 복제수정란 생산을 위한 기반기술이 확립되었다. 따라서 이러한 기반 기술을 이용하여 생산된 hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 형질전환난자는 대리모에 이식 중에 있으며, 추후 hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 형질전환 소를 개발하고자 한다.

## 결 론

본 연구는 체세포 복제 기술을 이용하여 hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 형질전환 소를 개발하고자, 우선 hGCSF와 GFP 유전자가 공동 발현하는 체세포 복제수정란의 생산 효율을 조사를 위해서 실시하였다. 이를 위하여 개발된 pPiggy-mWAP-hGCSF-EF1-GFP 벡터는 소 태아세포에 도입하였으며, 유전자 도입 후 GFP 유전자 발현을 통하여 유전자 발현 유무와 선별을 하였다. 이들 GFP 유전자 발현 체세포는 체외성숙된 소 성숙난자를 이용하여 체세포 복제 기술을 통하여 hGCSF-GFP가 공동 발현하는 형질전환 난자를 생산하였다. 이때 hGCSF-GFP가 공동 발현하는 체세포 복제수정란의 배반포는 일반 소 태아세포를 이용한 체세포 복제수정란과 단위발생란의 분할율 및 발달율과 비교하여 조사하였다. 그 결과, 단위발생란과 일반 체세포 복제수정란은 각각  $78.0\pm 2.8\%$ 와  $73.1\pm 3.2\%$ 의 분할률과 배반포의 발달률이 각각  $27.2\pm 3.2\%$ 와  $21.9\pm 3.1\%$ 로써 일반 체세포 복제수정란이 단위발생란에 비교하여 분할

률과 발달율이 저조하였다( $P<0.05$ ). 또한 hGCSF-GFP 공동 발현 소 태아세포를 이용하여 생산된 체세포 복제수정란에 있어서는 분할율과 배반포율이 각각  $70.4\pm 4.3\%$ 와  $17.0\pm 2.9\%$ 로써, 일반 체세포 복제수정란에 비교하여 배반포로의 발달율이 저조하였지만( $P<0.05$ ), 성공적으로 이식 가능한 hGCSF-GFP가 공동 발현하는 배반포를 생산하였다. 이상의 결과로 본 연구가 목표로 하고 있는 체세포 복제 기술을 이용하여 hGCSF와 GFP가 공동 발현하는 체세포 복제수정란의 생산 기반기술이 확립되었으며, 추후 이러한 기반 기술을 통하여 대리모에 이식 후 hGCSF-GFP가 공동 발현하는 형질전환 소를 개발하고자 한다.

## REFERENCES

- Batista RI, Melo CH, Souza-Fabjan JM, Teixeira DI, Melo LM and Freitas VJ. 2014. Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk. *Biotechnol. Lett.* 36:2155-2162.
- Cho SK, Kim JH, Park JY, Choi YJ, Bang JI, Hwang KC, Cho EJ, Sohn SH, Uhm SJ, Koo DB, Lee KK, Kim T and Kim JH. 2007. Serial cloning of pigs by somatic cell nuclear transfer: Restoration of phenotypic normality during serial cloning. *Dev. Dyn.* 236:3369-3382.
- 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.
- Doll DC and Weiss RB. 1983. Chemotherapeutic agents and the erythron. *Cancer Treat. Rev.* 103:185-200.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue 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.
- 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.
- 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.
- Krestel HE, Mihaljevic AL, Hoffman DA and Schneider A. 2004. Neuronal co-expression of EGFP and beta-galactosidase in mice causes neuropathology and premature death. Neurobiol. Dis. 17:310-318.
- Lee GS, Jeong YW, Kim JJ, Park SW, Ko KH, Kang M, Kim YK, Jung EM, Moon C, Hyun SH, Hwang KC, Kim NH, Shin T, Jeung EB and Hwang WS. 2014. A canine model of Alzheimer's disease generated by overexpressing a mutated human amyloid precursor protein. Int. J. Mol. Med. 33: 1003-1012.
- Mastromonaco GF and King WA. 2007. Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: Can the technology become a practical reality? Reprod. Fertil. Dev. 19:748-761.
- Miao X. 2013. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. Cell. Mol. Life Sci. 70:815-828.
- Rideout WM, Eggan K and Jaenisch R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. Science. 293: 1093-1098.
- Samoilov AV, Kesian AZ and Suraeva NM. 2013. Development of transgenic chicken with a gene of human granulocyte colony-stimulating factor using sperm-mediated gene transfer. Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. 5:517-521.
- Steinberg SE, Campbell CL, Rabinovitch PS and Hillman RS. 1980. The effect of trimethoprim/sulfamethoxazole on friend erythroleukemia cells. Blood. 1980 553:501-504.
- Uhm SJ, Kim NH, Kim T, Chung HM, Chung KH, Lee HT and Chung KS. 2000. Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo(R)) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. Mol. Reprod. Dev. 57:331-337.
- 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.

---

Received June 5, 2015, Revised July 14, 2015, Accepted August 24, 2015