한국동물자원과학회지 : 50(5) 641~648, 2008 J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.) 50(5) 641~648, 2008

소의 체세포핵이식태반과 정상태반간의 차등 발현 유전자 분석

유성란*・정행진*・상병찬*・류승희**・정기철*・윤종택***・성환후****・진동일*・이준헌*

충남대학교 동물자원과학부*, 충청남도 축산기술연구소**,
한경대학교 동물생명환경학부***, 축산과학원 응용생명공학과****

Identification of Differentially Expressed Genes Between Somatic Cell Nuclear Transfer and Normal Placenta in Cattle

Seong-Lan Yu*, Hang Jin Jeong*, Byung Chan Sang*, Seung Heui Ryoo**, Kie Chul Jung*, Jong Taek Yoon***, Hwan Hoo Seong****, Dong Il Jin* and Jun Heon Lee*

Division of Animal Science and Resources, Research Center for transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University*, Livestock Experiment Institute, Government of Chungcheongnam-Do**, Department of Animal Life Science, Hankyong National University***, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science****

ABSTRACT

There has been great success for making transgenic animals using somatic cell nuclear transfer (SCNT) up to this time. However, the success rates of the production of live transgenic animals are still very low. The current research has been carried out for delineation of differentially expressed genes between SCNT and normal placenta in cattle. In the present observations, high expression has been observed for CTSZ, LOC509426 and ELF1 genes in normal placenta. On the other hand, TIMP2, PAG1B, PAG-21, LOC782894, SERPINB6 and mKIAA2025 protein were highly expressed in SCNT placenta. Five genes, which were highly expressed in SCNT placenta, have been further investigated using semi-quantitative real-time PCR. The results were similar to that we observed using ACP. In the future, all genes affecting the SCNT and normal placenta have to be discovered and their networks will be fully investigated. The genes were identified in this study would be great help for identifying differential gene expressions in SCNT placenta.

(**Key words :** Somatic cell nuclear transfer (SCNT), Placenta, Annealing control primer (ACP), Differentially expressed genes (DEGs))

Ⅰ. 서 론

체세포핵이식 (somatic cell nuclear transfer: SCNT)을 이용해 dolly 복제양이 만들어진 이래로 체세포 방법을 이용하여 쥐, 소, 면양 및 돼지 등 여러 종에서 복제동물 (cloned mammal)들이 만들어졌고 이에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다 (Wilmut 등, 1997; Keeper, 2008). 그중 소에서도 1998년 미국의 매사추세츠대학에서 섬유아세포 (fibroblast cell)를 이용하여 복제소를 생산하였으며 (Cibelli 등, 1998) 이와 비슷한 시기에 프랑스의 INRA (I'institut National de la Recherche Agronomique) 그룹에서 송아지 태아의 근육과 피부조직 유래 체세포를 이용하

Corresponding author : J. H. Lee, Division of Animal Science and Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: 042-821-5779, Fax: 042-825-9754, E-mail: junheon@cnu.ac.kr

여 복제소를 생산하였다 (Vignon 등, 1998). 그러나, 복제동물을 생산하기 위한 계속적인 노력에도 불구하고 복제동물자손 (cloned offspring)의 생산 성공률은 매우 낮은 효율을 나타내고 있어 이 원인에 대한 연구가 진행되고 있다. 최근까지 연구된 보고들에 의하면 체세포핵이식을 한 수정란은 체외성숙 과정 중에 다수의 수정란이 사멸하고 임신 전반기에 태반의 발달 이상과 기능이상으로 태아가 사망하여 임신 비율이 낮아지는 것이 보고되었으며 (Hill 등, 2000; Wells 등, 1999; Cibelli 등, 1998) 임신 후반기는 태반소엽 (placentoma)의 수가 줄어드는 placentomegaly, 양수요막증 (hydrallantois)으로 태아가 지나치게 커지는 large offspring syndrome (LOS) 또는 large calf syndrome이 보고되고 있다 (Constant 등, 2006; Heyman, 2005). 이외에도 출생이후에 나타나는 이상증상과 사망 등에 대한 연구결과들이 보고되었다 (Hill 등, 1999). 이 원인들 중 태반이상은 쥐, 소 및 면양 등에서 공통적으로 발견되는 증상으로 태반의 정상적인 발달은 임신의 유지 및 자손을 생산하기 위해서 중요한 요소로 알려져 있다. 최근 Cross (2006)에 의하면 태반 발달과 기능을 위해서는 100개 이상의 유전자가 관여하고 있다고 보고될 정도로 태반 발달 및 유지를 위해서 많은 유전자가 관여하고 있음을 알 수 있다. 그러나 태반이 발달되는 각 단계별에 따라 발현되는 유전자들이 틀려 보다 정확하게 차등발현 유전자를 분석할 필요성이 제기되었다. 따라서 본 연구는 인공수정을 통해 정상 송아지를 분만한 태반과 체세포핵이식을 이용하여 송아지를 분만 후 송아지가 바로 사망한 태반사이에 발현 차이가 나는 유전자들을 동정하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 각 개체를 제왕절개하여 한우의 정상태반조직과 체세포핵이식을 통해 태어난 소의 태반조직을 이용하였다. 정상태반조직은 한경대학교로부터 한우를 인공 수정하여 태어난 정상태반 조직을 이용하였고 체세포핵이식한 태반은 축산과학원에서 체세포핵이식한 후 273일째에 출생 후 사망한 태아의 태반조직을 제공받아 본 연구에 이용하였다. 이들 태반조직은 채취 후 액체질소에 넣어 실험실로 운반하였으며 −70℃ deep freezer에 보관하여 연구에 사용하였다.

2. Total RNA 추출

각 태반 조직 250 mg을 액체질소 하에서 분쇄한 다음 RNeasy fibrous tissue midi kit (Qiagen, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분쇄된 각 시료에 ß-mercaptoethanol이 포함된 RLT buffer를 넣고 주사기를 이용해 완전히 분쇄시킨 다음 proteinase K를 첨가하여 55℃에서 20분간 반응시켜 단백질을 분해시켰다. 이 과정을 통하여 얻어진 용액을 원심분리시켜 상층액과 조직파편을 분리시켰으며 상층액만을 취하여 0.5배의 100% 에탄올을 첨가한 다음 column에 넣어 원심분리시켜 total RNA를 silica-gel membrane에 결합시켰다. 이 membrane을 RW1 buffer로 세척한 후 DNase I으로 실온에서 15분간 반응시켜 genomic DNA을 분해시킨 다음 RW1 buffer를 넣고 원심분리하여 다시 씻어낸 후 두 번의 RPE buffer로 column을 세척하였다. 마지막으로 RNase-free water로 column에서 total RNA를 분리하였다. 추출된 total RNA의 농도와 순도는 spectrophotometer (Ultrospec2000, Pharmacia, USA)를 이용하여 260 nm 파장에서 측정하였고, denaturing 1% agarose gel에서 추출된 total RNA상태를 확인하였다.

3. cDNA 합성과 ACP(Annealing Control Primer)-based GeneFishing PCR

정상태반과 체세포핵이식 태반사이에서 발현이 차이가 나는 유전자들을 확인하기 위해 역전사반응 (reverse transcription reaction)으로 cDNA를 합성하였다. 이 반응은 각 조직 total RNA 5 ㎍에 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4

mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 각 0.5 mM dNTP, 0.5 μM Oligo $(dT)_{15}$ annealing control primer (ACP) (GeneFisihing™ DEG kit, Seegene, Korea), 1 unit RNase inhibitor 및 10 unit M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs, USA)을 첨가하여 42℃에서 1시간 30분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음 20개의 arbitrary primer, dT-ACP2 primer (Gene-Fisihing™ DEG kit, Seegene, Korea)을 이용하여 second-strand cDNA를 합성을 실시하였다. 이 반응액의 조성은 약 50 ng first-strand cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 각 0.2 mM dNTPs, 10 μM 각 arbitrary ACP primer (GeneFisihing™ DEG kit, Seegene, Korea), 10 μM dT-ACP2 primer (GeneFisihing™ DEG kit, Seegene, Korea), 2.5 unit Taq DNA polymerase (Roche Applied Scienc, USA)으로 구성하였다(Kim 등, 2004). PCR은 GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 94℃에서 5분, 50℃에서 3분, 72℃에서 1분 1회 반응하여 second-strand cDNA를 합성한 후, 94℃에서 40초, 65℃에서 40초, 72℃에서 40초 동안 40회를 실시하였다.

4. 차등 발현 유전자의 cloning과 염기서열 분석

PCR 생산물들은 2% agarose gel을 이용하여 전기 영동한 후 차등 발현 band를 확인하였다. 발현차이를 나타내는 band들은 GENECLEAN ⅡKit (Q.BIOgene, USA)를 이용하여 agarose gel 절편으로부터 DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA는 TOPO TA cloning system (Invitrogen, USA)를 이용하여 cloning 하였으며, QIAprep spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA)으로 plasmid DNA를 추출하였다. 추출된 plasmid에 삽입된 PCR 생산물들의 염기서열분석은 ABI 3770 자동 염기서열분석기(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 확인된 염기서열은 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)의 BLAST 프로그램을 이용하여 가장 상동성이 높은 유전자들을 확인하였다.

5. Quantitative real-time PCR

염기서열분석을 통해 정상태반보다 체세포핵이식 태반에서 발현량이 높았던 Thrombin inhibitor, pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG1), pregnancy-associated glycoprotein 21 (PAG21), Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2) 및 Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6 (SERPINB6) 5개유전자를 선택하여 Rotor Gene 2000 (Crobett Research, Australia)을 사용하여 quantitative real-time PCR을 수행하였으며 이때 유전자 발현의 internal control로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPADH)와 β-actin 유전자를 이용하였다. PCR은 2 μl cDNA, 2× SYBR Green PCR premix와 각 10 pmol primer를 이용하였으며 분석시료당 3반복으로 실험을 수행하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 변성시키고, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 25회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 이 발현량의 차이는 Rotor Gene Analysis Software version 6.0 (Crobett Research, Australia)을 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

체세포핵이식태반과 정상태반 사이에 서로 다르게 발현되는 유전자들을 발굴하기 위하여 태어난 후 바로 사망하였지만 조직학적 소견에는 이상이 없는 체세포핵이식태반과 인공수정을 이용하여 송아지를 획득한 정상태반에서 total RNA를 추출하였고 이 total RNA를 총 20개의 arbitrary ACP (Seegene, Korea)들을 이용하여 RT-PCR한 결과 6개 arbitrary ACP에서 발현차이가 나는 8개 band를 확인하였으며 이중 3개의 band는 정상태반에서 발현이 증가하였고 체세포핵이식태반에서는 5개의 band가 발현이 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 그러나, 이 band들만으로는 발현의 차이를 보이는 유전자를 알 수 없기 때문에 agarose gel로부터 band들을 추출하여 TA vector에 cloning한 다음 염기서열을 분석하였고 이 염기서열을 바탕으로

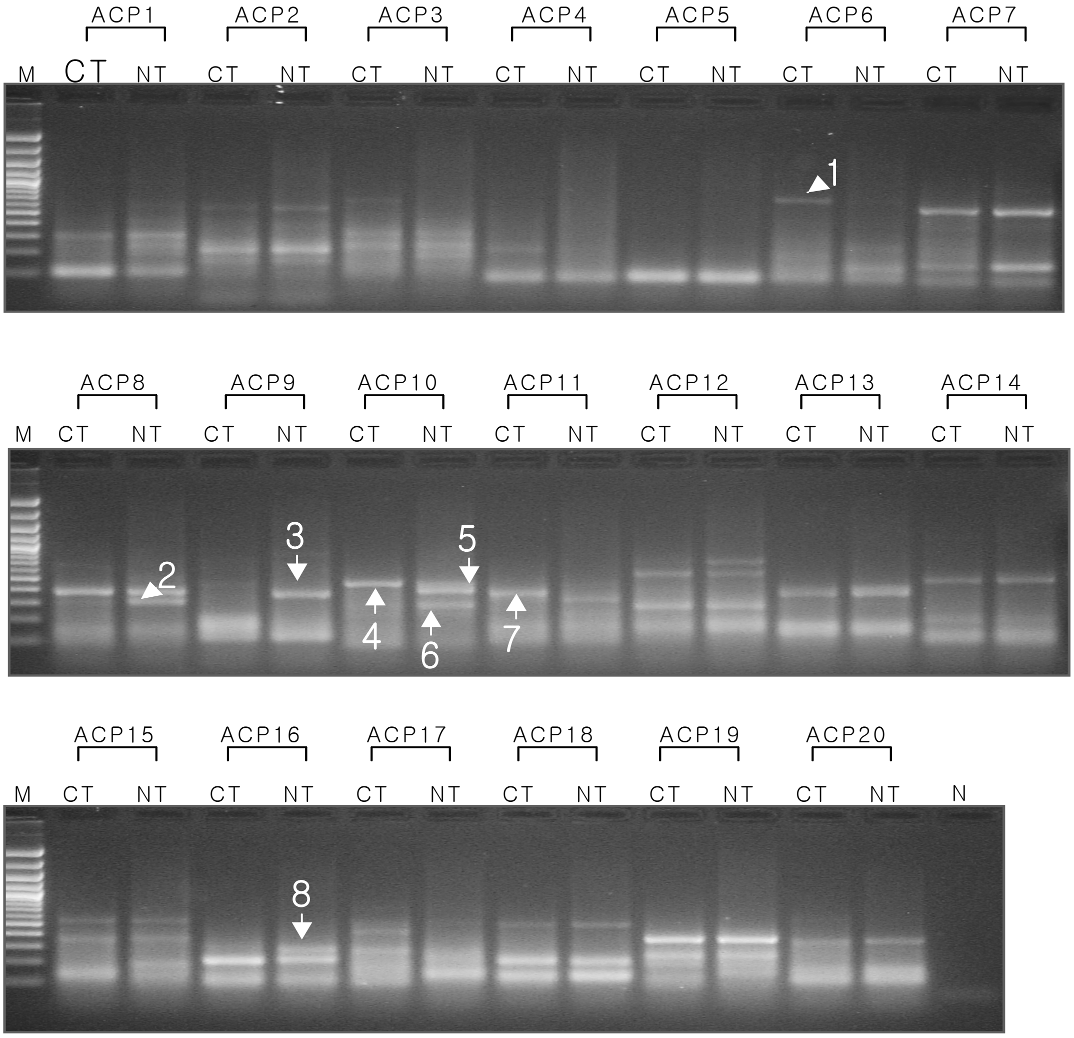

Fig. 1. PCR results for identifying differentially expressed genes between normal and nuclear transfer placenta using arbitrary annealing primers (ACP1 to ACP20).
lane M: 100 bp size marker, lane CT: normal placenta, lane NT: SCNT placenta. The differentially expressed PCR products were indicated as arrows (numbers 1 to 8).

정확한 유전자를 밝히기 위하여 BLAST search 한 결과 ACP9은 두 개의 유전자로 확인되어 총 9개의 유전자를 확인할 수 있었다. 이 중 8개의 유전자는 소에서 유래된 염기서열을 확인할 수 있었으나 1개의 유전자는 rat와의 상동성을 확인할 수 있었다. BLAST search에 의해 확인된 차등발현 유전자는 다음과 같다. 정상태반에서 발현이 증가한 3개의 유전자는 cathepsin Z (CTSZ), 40S ribosomal protein S26-2-like 및 E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)이고 체세포핵이식태반에서는 Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2), Pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG1B), Pregnancy-associated glycoprotein 21 (PAG-21), similar to thrombin inhibitor, Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6 (SERPINB6)와 mKIAA2025 protein임을 확인할 수 있었다 (Table 1). 그러나 이 실험 결과만으로는 각 유전자들의 발현차이를 확실

Table 1. Identification of differentially expressed genes between normal and nuclear transfer placenta

No.*	Gene name	GeneBank accession No.	Best matching species	e-value	up-regulated sample
1	Cathepsin Z (CTSZ)	XM_001249470.1	Bovine	0.0	Normal placenta
2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)	NM_174472.3	Bovine	0.0	Nuclear transfer placenta
3	Pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG1B)	NM_174411.2	Bovine	0.0	Nuclear transfer placenta
	Pregnancy-associated glycoprotein 21 (PAG-21)	NM_176630.2	Bovine	0.0	Nuclear transfer placenta
4	40S ribosomal protein S26-2-like (LOC509426)	NM_001015561.2	Bovine	0.0	Normal placenta
5	similar to Thrombin inhibitor (LOC782894)	XM_001249946.1	Bovine	0.0	Nuclear transfer placenta
6	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member6 (SERPINB6)	NM_174789.1	Bovine	0.0	Nuclear transfer placenta
7	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor) (ELF1)	XM_001253221.1	Bovine	0.0	Normal placenta
8	mKIAA2025 protein	XM_001073854.1	rat	5e-51	Nuclear transfer placenta

* Numbers indicate the differetially expressed PCR products in Fig. 1

하게 확인하기 어렵기 때문에 체세포핵이식에서 발현량이 높았던 6개 유전자들 중 알려지지 않은 mKIAA2025 protein을 제외한 5개의 유전자를 선택하여 quantitative real-time PCR로 발현량의 차이를 재확인하였다. 그 결과 체세포핵이식태반에서 발현량이 높았던 5개의 유전자들이 Fig. 2에서와 같이 발현량이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

발현량에 차이가 나타나는 유전자들은 기존에 발표된 논문에 기초하여 그 기능을 유추하였다. CTSZ 유전자는 세포내 단백질의 분해대사, 세포외기질(extracellular matrix) 퇴화 및 전호르몬 (pro-hormone)의 처리 등의 생물학적 기능을 가지고 있는 cathepsin family에 속하는 유전자로 Song 등 (2007)에 의하면 면양의 자궁내막(endometrium)과 태반소엽(placentome)에서 발현이 높고 특히 임신 후반기에 태반소엽에서 발현량이 증가함을 보고하고 있으며 정상적인 수정란의 착상과 임신진행시 태반의 변화에 필요한 유전자인 것으로 보고되어졌다. 따라서 본 유전자가 체세포핵이식태반에서 보다 정상태반에서 발현량이 높은 것은 정상적인 출산을 위한 태반의 변화를 유도하기 위한 차이인 것으로 추측할 수 있다.

TIMP2는 태반의 거대 이핵세포(bionucleate cell)에서 임신 전기간동안 발현되는 유전자로써 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinase family들 중 matrix metalloproteinase 2 (MMP2)의 발현을 억제시키므로 임신을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Walter와 Boos, 2001). 정상적인 태반의 경우에는 정상적으로 분만한 후 TIMP2 유전자의 발현량이 감소하는 것이 보고되어있다(takagi 등, 2007). 그러나, 체세포핵이식을 한 소의 태반에서는 TIMP2 유전자의 발현이 정상태반에서 비해 감소하지 않았다. 이 결과는 Kim 등(2005)에 의해 체세포핵이식태반과 정상태반사이의 단백질을 비교한 결과와 같은 결과이며 생쥐에서는 ES cell을 핵이식한 태반에서 TIMP family중 TIMP3의 발현이 증가한 것이 보고(Suemizu 등, 2003) 되었으므로 이 유전자는 체세포핵이식을 하므로 인해 유전자의 발현에 조절이 정상적으로 일어나지 못하여 발현이 증가하는 유전자임을 확인할 수 있다.

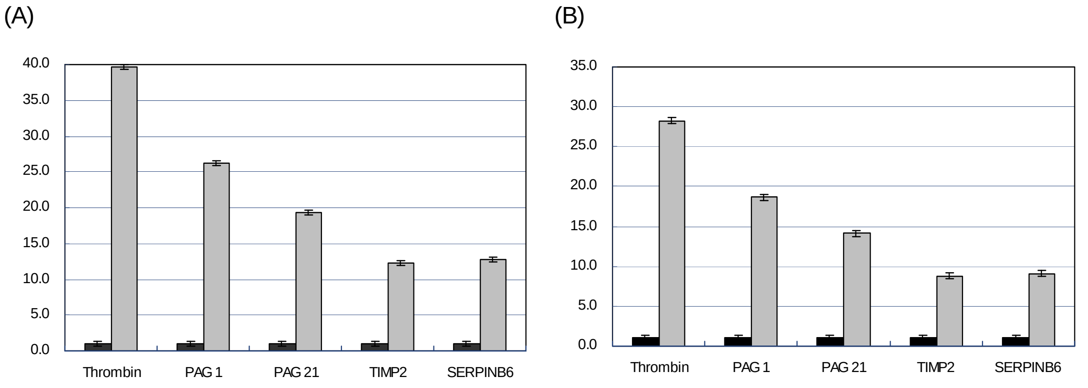

Fig. 2. The mRNA expression patterns of highly expressed genes in nuclear transfer placenta using quantitative real-time PCR. The numbers in vertical line indicate fold differences. The gene expression levels of each gene were normalized to the expression level of beta-actin (A) and GAPDH (B) as expression controls. Black bar indicated mRNA expression in normal placenta, gray bar indicated mRNA expression in nuclear transfer placenta.

PAG유전자는 pepsin, cathepsin 및 renin들을 포함하는 aspartyl protease으로 생리학적 기능은 잘 알려져 있지 않으나 임신진단 및 태아와 태반의 활성의 marker로 사용되고 있고 PAG1B의 plasma 농도는 초기 임신시 태아의 유산과 관련된 유전자로 임상적 응용에 이용할 수 있고 (Lopez-Gatius 등, 2007) 체세포 핵이식한 소의 태반에서 발현이 높음이 보고되었다(Patel 등, 2004). 따라서 본 실험결과에서 나타난 것과 같이 체세포핵이식한 태반에서 발현이 증가하는 것은 임신 유지와 관련된 것으로 추정된다. PAG21유전자는 아직 명확한 기능이 알려져 있지 않으나 PAG1B와 같은 family로 유사한 기능을 할 것으로 추정된다.

Thrombin inhibitor와 유사한 염기서열을 가지고 있는 것으로 밝혀진 이 유전자는 serine-type endopeptidase inhibitor의 활성을 가지며 이 유전자는 사람의 SERPINB6 단백질과 75.3%의 상동성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 본 실험에서도 SERPINB6가 체세포핵이식태반에서 발현이 높아짐이 확인되었다. SERPINB6는 Coughlin 등(1993)에 의해 serine proteinase를 저해하는 기능을 가진 유전자로 사람의 태반과 백혈병 세포(leukemic cell) K562에서 확인되었다. 이 유전자는 placental thrombin inhibitor (PTI)라고도 불리며 쥐의 경우에 이 유전자를 결핍시킨 경우는 확실한 병리학적 변화를 확인할 수 없었으나 체내의 항상성에 의한 보상작용으로 인해 다른 protease inhibitor가 증가하였음을 보고하였다(Scarff 등, 2004). 이 유전자에 의해 저해되는 유전자인 thromibin은 Stephenson 등(2005)의 보고에 의하면 분만과 관련된 유전자인 MMP-9의 발현을 조절하는 것으로 보고하였다. 최근 Takagi 등(2007)에 의하면 임신시기와 분만 후의 태반을 가지고 MMP-9의 발현량을 확인한 결과 MMP-9은 임신시기에는 거의 발현이 되지 않다가 분만후에 발현이 증가하는 것으로 확인되었다. 이것은 thrombin의 발현량 역시 분만 후에 증가할 것으로 추정된다. 그러나 이 실험결과에서는 thrombin의 발현 유무는 확인할 수가 없었으며 thrombin의 발현을 저해하는 SERPINB6의 발현이 높아지는 것이 확인되었다. 이와 같은 결과로서 체세포핵이식에 의한 유전자 발현의 변화인 것으로 추정할 수 있다. 따라서 thrombin과 TIMP2 유전자는 임신시에 fetal membrane이 자궁에서 떨어져 나가는 것을 막고 분만 후에는 fetal membrane의 분리를 통제하여 임신을 유지시키는데 중요한 유전자들로 추정된다.

본 실험을 통해 소에서 정상태반과 체세포핵

이식태반에서 발현 차이를 보이는 유전자들을 확인하였으며 각각 그들의 기능을 유추하여 보았다. 그러나 이 실험에 사용된 체세포핵이식태반은 앞서 언급한 바와 같이 복제동물을 생산 성공률이 낮기 때문에 실험재료 확보에 제한이 있어 본 실험에는 하나의 샘플만을 이용하였다. 하지만, 3반복의 real-time PCR 실험이 재연성을 나타내었을 뿐만 아니라 본 결과에서 확인된 유전자들 중 다른 논문들에 의해 체세포핵이식태반과 관련된 유전자들로 이미 밝혀진 유전자들도 포함되므로 본 실험의 결과는 신빙성이 있다고 사료된다. 이는 임신 유지와 태반에서 발현하는 유전자들 중 극히 일부분만이 확인되었으므로 앞으로 복제 효율을 향상시키기 위해 더 많은 노력들이 필요할 것이라 사료된다.

Ⅳ. 요 약

체세포핵이식을 이용하여 복제동물을 생산하고자하는 연구가 계속적으로 진행되고 있으며 현재까지 많은 성과를 거두고 있으나 복제동물의 성공률이 현저히 낮은 것은 잘 알려진 사실이다. 본 연구에서는 복제동물생산과 관련된 여러 가지 이유 중 정상태반과 체세포복제소의 태반사이의 차등발현 유전자를 발굴하기 위해서 각각의 태반에서 total RNA를 추출하였고 이를 20개의 arbitrary ACPs를 이용하여 정상과 체세포이식태반사이에서 차등발현되는 유전자를 조사한 결과 8개의 발현차이를 보이는 band를 확인할 수 있었고 이 유전자들의 염기서열을 이용하여 BLAST search한 결과 정상태반에서는 CTSZ, LOC509426 및 ELF1 유전자의 발현이 높았고 체세포이식태반에서는 TIMP2, PAG1B, PAG-21, LOC782894, SERPINB6 및 mKIAA2025 protein 유전자의 발현이 높아 총 9개의 차등발현 유전자를 확인할 수 있었다. 이 결과중 체세포핵이식태반에서 발현이 높은 유전자중 아직까지 기능이 밝혀지지 않은 mKIAA 2025 protein를 제외하고 5개의 유전자는 quantitative real-time PCR를 이용하여 유전자의 발현을 재확인하여 체세포핵이식태반에서 발현이 높음을 재확인하였다. 본 연구는 체세포핵이식태반에서 발현차이를 보이는 유전자들 중 극히 일부분만을 확인하였으나 앞으로 더 많은 유전자들과 상호관계를 확인한다면 체세포복제 생산에서 태반내의 유전자 변화에 관한 기전을 밝히는데 도움이 될 것이라고 사료된다.

Ⅴ. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호:20070401034031)과 한국과학재단의 ERC program(과제번호:R11-2002-100-00000-0)의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

Ⅵ. 인 용 문 헌

1. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science. 280(5367):1256-1258.
2. Constant, F., Guillomot, M., Heyman, Y., Vignon, X., Laigre, P., Servely, J. L., Renard, J. P. and Chavatte-Palmer, P. 2006. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. Biol. Reprod. 75(1):122-130.
3. Coughlin, P., Sun, J., Cerruti, L., Salem, H. H. and Bird, P. 1993. Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(20):9417-9421.
4. Cross, J. C. 2006. Placental function in development and disease. Reprod. Fertil. Dev. 18(1-2):71-76.
5. Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of Cloned Calves Following Nuclear Transfer with Cultured Adult Mural Granulosa Cells. Biol. Reprod. 60:996-1005.
6. Farin, P. W., Piedrahita, J. A. and Farin, C. E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos.

Theriogenology. 65(1):178-191.

7. Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X. and Renard, J. P. 2002. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. Biol. Reprod. 66:6-13.
8. Heyman, Y. 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. Reprod. Nutr. Dev. 45(3):353-361.
9. Hill, J. R., Roussel, A. J., Cibelli, J. B., Edwards, J. F., Hooper, N. L., Miller, M. W., Thompson, J. A., Looney, C. R., Westhusin, M. E., Robl, J. M. and Stice, S. L. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). Theriogenology. 51(8):1451-1465.
10. Hill, J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson, J. A. and Westhusin, M. E. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. Biol. Reprod. 62(5):1135-1140.
11. Hill, J. R., Brughardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T, Spencer, T. E., Thompson, J. A. Winger, Q. A. and Westhusin, M. E. 2000. Evidence for Placental Abnormality as the Major Cause of Mortality in First-Trimester Somatic Cell Cloned Bovine Fetuses. Biol. Reprod, 63:1787-1794.
12. Keefer, C. L. 2008. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). Theriogenology. 69:48-54.
13. Kim, H. R., Kang, J. K., Yoon, J. T., Seong, H. H., Jung, J. K., Lee, H. M., Sik Park, C. and Jin, D. I. 2005. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer. Proteomics. 5(16):4264-4273.
14. Kim , Y. J., Kwak, C. I., Gu, Y. Y., Hwang, I. T. and Chun, J. Y. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. Biotechniques. 36(3):424-426, 428, 430 passim.
15. Lopez-Gatius, F., Hunter, R. H., Garbayo, J. M., Santolaria, P., Yaniz, J., Serrano, B., Ayad, A., de Sousa, N. M. and Beckers, J. F. 2007. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. Theriogenology. 67(8):1324-1330.
16. Patel, O. V., Yamada, O., Kizaki, K., Takahashi, T., Imai, K., Takahashi, S., Izaike, Y., Schuler, L. A., Takezawa, T. and Hashizume, K. 2004. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancies. Biol. Reprod. 70(4):1114-1120.
17. Scarff, K. L., Ung, K. S., Nandurkar, H., Crack, P. J., Bird, C. H. and Bird, P. I. 2004. Targeted disruption of SPI3/Serpinb6 does not result in developmental or growth defects, leukocyte dysfunction, or susceptibility to stroke. Mol. Cell. Biol. 24(9):4075-4082.
18. Stephenson, C. D., Lockwood, C. J., Ma, Y. and Guller, S. 2005. Thrombin-dependent regulation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in human fetal membranes. J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. 18(1):17-22.
19. Suemizu, H., Aiba, K., Yoshikawa, T., Sharov, A. A., Shimozawa, N., Tamaoki, N. and Ko, M. S. 2003. Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells. Dev. Biol. 253(1):36-53.
20. Takagi, M., Yamamoto, D., Ohtani, M. and Miyamoto, A. 2007. Quantitative analysis of messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum. Mol. Reprod. Dev. 74(7):801-807.
21. Vignon, X., Chesne, P., Le Bourhis, D., Flechon, J. E., Heyman, Y., and Renard, J. P. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie. 321(9):735-745.
22. Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol. Reprod. 60(4):996-1005.
23. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 385(6619):810-813.

(접수일자 : 2008. 8. 21. / 수정일자 : 2008. 9. 17. / 채택일자 : 2008. 10. 8.)