

Review Article

유전자 편집 기술에 의한 형질전환 가축의 생산 현황

박다솜¹, 김소섭², 구덕본³, 강만종^{1,*}

¹전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, ²광개토태왕우, ³대구대학교 공과대학 생명공학과

Current Status of Production of Transgenic Livestock by Genome Editing Technology

Da Som Park¹, Soseob Kim², Deog-Bon Koo³ and Man-Jong Kang^{1,*}

¹Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

²Gwanggaeto Hanwoo, Gyeongsan 38622, Korea

³Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

Received September 11, 2019

Revised September 16, 2019

Accepted September 17, 2019

*Correspondence

Man-Jong Kang

E-mail: mj kang@chonnam.ac.kr

ORCID

https://orcid.org/0000-0002-7628-0614

ABSTRACT The Transgenic livestock can be useful for the production of disease-resistant animals, pigs for xenotransplantation, animal bioreactor for therapeutic recombinant proteins and disease model animals. Previously, conventional methods without using artificial nuclease-dependent DNA cleavage system were used to produce such transgenic livestock, but their efficiency is known to be low. In the last decade, the development of artificial nucleases such as zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas has led to more efficient production of knock-out and knock-in transgenic livestock. However, production of knock-in livestock is poor. In mouse, genetically modified mice are produced by co-injecting a pair of knock-in vector, which is a donor DNA, with a artificial nuclease in a pronuclear fertilized egg, but not in livestock. Gene targeting efficiency has been increased with the use of artificial nucleases, but the knock-in efficiency is still low in livestock. In many research now, somatic cell nuclear transfer (SCNT) methods used after selection of cell transfected with artificial nuclease for production of transgenic livestock. In particular, it is necessary to develop a system capable of producing transgenic livestock more efficiently by co-injection of artificial nuclease and knock-in vectors into fertilized eggs.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome-editing, livestock animal, transgenic

서론

형질전환 동물은 고전적으로 인위적으로 유전공학 기술을 이용

하여 동물의 유전체에 외래 유전자가 도입된 동물을 말한다. 이러한 동물은 1982년 세계 최초로 미국의 Palmiter와 Brinster 그룹에 의하여 성장호르몬 유전자가 도입된 거대생쥐가 개발된 이후

1985년에는 Hammer 그룹에 의해서 가축인 토끼, 돼지, 양에서도 사람 성장호르몬을 생산하는 형질전환 가축이 개발된 이후 오랜 기간에 걸쳐 다양한 형질전환 동물이 생산되었다. 형질전환 동물 생산 기술은 모델 생물체에서 유전자의 기능의 검증, 질병모델 동물, 장기이식용 돼지 및 유용 단백질 생산 동물을 개발하는데 널리 이용되고 있다(Clark, 1998; Houdebine, 2000; Robl 등, 2007; Houdebine, 2009). 고전적으로 이러한 형질전환동물의 생산 방법에는 미세주입법(microinjection), 레트로바이러스 벡터법(retroviral vector), 배아줄기세포 및 체세포를 이용한 동물 복제법 등이 이용되어 왔다. 초기의 형질전환동물 생산은 주로 외래 유전자를 전핵기 수정란의 핵에 미세조작기를 이용하여 미세주입한 후 대리모에 수정란을 이식하는 방법으로 개발되었다. 이러한 방법에 있어서 주로 외래 유전자를 운반하는 벡터는 일반적인 promoter와 발현 하고자 하는 유전자를 연결하여 유전체에 무작위적으로 삽입되는 벡터를 이용하였다. 이러한 방법에 의한 형질전환 산자의 생산 효율이 2 내지 3%로 매우 낮으며 삽입된 유전자의 위치도 무작위로 삽입되어 promoter 특이적으로 유전자의 발현이 되지 않거나 그 발현이 낮은 경우가 일반적이다(Clark, 1998; Robl 등, 2007; Houdebine, 2009). 또한 위에서 설명한 고전적 방법으로 형질전환 동물을 생산하는 경우 특정 유전체 위치에 외래 유전자를 삽입하거나 특정 유전자에 변이를 도입하는 것이 가능하지 않았다(Wolf 등, 2000; Robl 등, 2007).

따라서 이러한 부분을 해결하기 위하여 특정 유전자 위치에 상동유전자 재조합에 의하여 변이된 외래 유전자를 삽입하거나, 특정 엑손을 제거하거나 또는 점돌연변이를 도입하는 유전자 적중(gene targeting) 방법이 개발되었다(Clark 등, 2000; Piedrahita, 2000; Denning과 Priddle, 2003; Wang과 Zhou, 2003). 유전자 적중은 Smithies 등(Smithies 등, 1985)에 의하여 배양 중인 세포의 β -글로빈 유전자에 대해서 처음으로 성공하였으며, 이러한 시스템을 이용하여 생쥐 줄기세포의 *Hprt* 유전자 위치에 변이된 유전자를 삽입하는 유전자 적중 기술이 적용되었으며, 이들 *Hprt* 유전자가 결실된 줄기세포를 이용하여 세계 최초로 knock-out 생쥐가 유전자 적중 방법에 의하여 생산되었다(Schwartzberg, 1989; Doetschman 등, 1998; Ledermann, 2000). 이러한 유전자 적중 생쥐의 생산은 유전자 기능을 생체에서 연구하는데 매우 중요한 도구로 이용되었으며 수많은 knock-out 생쥐들이 개발 보고되었다. 이러한 유전자 적중 방법과 체세포 복제 방법을 이용하여 가축에서도 유전자 적중 양이 McCreath 등(McCreath 등, 2000)에 의하여 생산되었다. 그렇지만 고전적 유전자 적중 방법은 생쥐 줄기세포 또는 체세포에 유전자 적중 벡터를 도입하고 선별한 후 동물을 생산하는 기술로서 많은 시간, 고도의 기술과 비용이 필요하였다.

그러나 최근에는 유전자 가위인 zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs)와 clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas 시스템이 개발되어 생쥐를 포함

한 다양한 동물에서 고전적 형질전환 동물의 생산 방법 보다 수월하게 형질전환 동물 또는 유전자 편집 동물이 생산되고 있다(Sander와 Joung, 2014; Yang 등, 2014; Petersen, 2017; Park, 2019).

따라서 본 총설에서는 유전자 가위를 이용하여 생산되는 유전자 적중 형질전환 가축의 현황을 살펴보고 그 방법 등에 대해서 가축에서의 응용에 대해서 기술하고자 한다.

유전자 가위(Programmable Nuclease)와 유전자 적중

최근에는 유전자 가위가 개발되어 유전자의 편집을 세포내 또는 수정란 내에서 유도할 수 있어 고전적 방법보다 다양한 형질전환 동물의 생산이 매우 수월하게 이루어지고 있다.

유전자 가위는 zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs)와 clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas 시스템이 보고되고 있다(Gaj 등, 2013; Sakuma와 Woltjen, 2014; Tan 등, 2016).

ZFNs를 구성하는 zinc-finger는 전사인자의 DNA-결합 모터프 중 하나이며 이러한 zinc-finger는 약 30개의 아미노산으로 이루어져 있으며 zinc-finger를 구성하는 α -나선은 DNA major groove의 3개의 염기와 결합하여 zinc-finger DNA-binding domain를 구성한다. 따라서 ZFNs는 이러한 zinc-finger 3-6개의 모듈이 9-18개의 염기쌍을 인식할 수 있는 zinc-finger DNA-binding domain과 DNA-cleavage domain으로 구성된 인공핵산분해효소로서 작용을 한다. ZFNs의 DNA-cleavage domain에는 제한효소 FokI의 DNA 절단 domain이 결합되어 있어서 ZFNs가 결합한 옆쪽 DNA를 절단되게 되어 double-strand breaks (DSBs)을 유도하는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 1996).

TALENs은 ZFNs와 유사하게 TAL effector DNA-binding domain과 DNA cleavage domain으로 구성되어 있으며 TAL effector는 식물을 감염시키는 세균인 *Xanthomonas* 속에서 발견되었고 이들은 33-34개의 아미노산 반복 도메인이 각각 하나의 DNA 염기쌍을 인지하는 것으로 알려져 있다. 여러 개의 TAL effector 모듈을 연결하면 연속적인 DNA 염기서열을 인식할 수 있는 장점이 있으며 3개의 연속적 염기를 인식하는 zinc-finger보다 유연한 디자인을 할 수 있는 장점이 있는 것으로 알려져 있다. TALENs의 DNA cleavage domain은 ZFNs와 마찬가지로 제한효소 FokI을 이용하고 있으며 그 기작은 ZFNs와 동일하다(Christian 등, 2010; Cermak 등, 2011).

Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas 시스템은 ZFNs나 TALENs과는 다르게 더 쉽고 간편한 대안으로 최근에 보고되고 있다. 이러한 시스템은 RNA-guided DNA endonucleases (RGENs)이라고도 불리며

Archea와 세균에서 외부에서 침입한 DNA에 대해서 획득성 면역 시스템으로 작동하여 외부 침입 DNA를 절단하는 기능을 가지고 있다(Makarova 등, 2011).

이러한 유전자 가위는 target으로 하는 특정 DNA 위치에서 DNA double strand break를 유도하며 절단된 부위에 non-homologous end joining (NHEJ)에 의해 일어나는 indel현상으로 몇 염기가 제거되거나 삽입되는 것으로 보고되고 있다(Gaj 등, 2013; Sakuma와 Woltjen, 2014; Tan 등, 2016). 또한 이러한 유전자 가위를 이용한 indel에 의하여 세포 또는 개체에서 특정 유전자가 knock-out되기도 하고, 유전자 가위와 donor DNA (Knock-in vector)를 도입하면 homologous recombination (HR)에 의하여 특정 genome 위치에 외래 유전자를 보다 쉽게 삽입되어 knock-in이 되기도 한다고 알려져 있다(Wyman와 Kanaar, 2006). 그리고 현재는 NHEJ와 HR뿐만 아니라 alternative nonhomologous end-joining이라고도 불리는 microhomology-mediated end joining (MMEJ)의 개념도 있으며 이는 긴 상동영역을 요구하는 HR과는 다르게 5-25 bp의 짧은 상동영역을 이용하여 DNA를 repair 할 수 있는 것으로 보고되고 있다(McVey와 Lee, 2008). 이러한 NHEJ는 세포주기 중 G2기와 M기에 활성화되는 반면 HR은 S기에 활성화된다고 보고되고 있으며(Mao, 2008), MMEJ는 세포 주기 중 G1기와 초기 S기에 활성화되는 것으로 알려져 있다(Taleei와 Nikjoo, 2013).

유전자적중(gene targeting)이란 세포의 특정 내부유전자를 HR의 방법으로 변형시키는 기술로서 유전자적중을 통해 특정 염색체 내에 유전자에 변이를 도입하여 유전자의 발현을 제거하거나(knock-out), 특정 염색체 내에 존재하는 유전자위치에 외래 유전자를 삽입하여 유전자의 내인성 유전자발현 조절영역을 이용하여 외래유전자를 발현시키는(knock-in) 방법으로 알려져 있다(Yáñez와 Porter, 1998). 이러한 유전자적중은 1985년에 처음 인간 β -globin 유전자 위치에 HR을 통해 targeting 벡터를 삽입하는데 실험적으로 성공하면서 유전자 편집에 활용되기 시작했다고 알려져 있다(Smithies 등, 1985). 또한 1987-1988년에는 여러 연구자들이 배아줄기세포기술을 유전자적중에 적용하여 HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 유전자를 mouse embryo-derived stem (ES) cell에서 제거하는 것을 성공하였다고 보고하였다(Thomas와 Capecchi, 1987; Doetschman 등, 1988). 1989년엔 최초로 hPRT knock-out 배아줄기세포를 통해 형질전환 knockout 마우스가 생산되었고(Koller 등, 1986), 이러한 유전자 적중 기술과 배아줄기세포를 이용하여 knock-out뿐만 아니라 knock-in도 할 수 있다고 알려져 있다(Jasin 등, 1996). 이러한 유전자적중 기술의 확립을 통해 돌연변이 마우스의 생산이 크게 증가되었으며(Brandon 등, 1995), 가축에서는 당시 배아줄기세포를 확보하는 것에 많은 어려움이 따라 체세포를 이용하여 유전자적중을 시도하였다(Clark 등, 2000). 2000년 처음으로 유전자 가위를 사용하지 않고 고전적 방법으로 양에서 somatic cell nuclear transfer (SCNT)

를 통해 양의 $\alpha 1$ procollagen (COL1A1) 위치에서 human $\alpha 1$ -antitrypsin (hAAT)이 발현하는 유전자 적중된 형질전환양이 생산되었다고 보고하였다(McCreath 등, 2000).

이러한 유전자 적중은 유전자 가위의 개발에 따라 줄기세포 또는 체세포를 이용하여 유전자 적중된 세포를 선별하고 그 세포를 이용하여 형질전환 동물을 생산하는 시대에서 전핵기 수정란 또는 2세포기 수정란에 유전자 가위 단독 또는 donor DNA (gene targeting vector)와 함께 도입하여 고전적 방법 보다 수월하게 동물을 생산하는 시대로 변하고 있다.

유전자 가위를 이용한 유전자 편집에 의한 가축 생산

많은 연구자들이 특정 내부 유전자 위치에 정확하게 외래 유전자를 삽입할 수 있는 유전자적중을 이용하고 있지만 아직까지 유전자적중 효율이 매우 낮다는 한계점이 있다. 고전적인 방법으로 유전자 가위를 사용하지 않고 유전자적중을 했을 때는 0.1% 정도로 그 효율이 낮은 것으로 보고되고 있다(Bollag 등, 1989). 특히 가축의 체세포에서 상동재조합의 효율은 마우스 배아줄기세포를 이용하였을 때보다 더욱 낮은 것으로 알려져 있다(Thomson 등, 1998; Sedivy 등, 1999). 양에서 이중 간 장기이식 시 급성 거부반응을 일으키는 $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase (GGTA1) 유전자가 knock-out된 체세포는 1.1%의 효율로 확보되었고, prion disease을 일으키는 PrP 유전자를 제거한 양의 체세포를 10.3%의 효율로 확보하여 SCNT를 통해 PrP 유전자가 제거된 복제 양을 생산했다고 보고되고 있다(Denning 등, 2001). 또한 돼지에서도 $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase (GGTA1) 유전자가 제거된 형질전환돼지가 somatic cell nuclear transfer (SCNT)로 생산되었으며, 그 효율은 1.5-5%로 보고되었다(Dai 등, 2002; Lai 등, 2002). 그리고 염소의 β -casein위치에 htPAm 유전자가 발현하는 체세포를 개발하였으며 유전자적중효율은 0.8-1.1%로 낮은 것으로 알려져 있다(Shen 등, 2007).

이처럼 유전자 가위를 사용하지 않고 유전자적중을 시도했을 때는 그 효율이 낮아 유전자적중 효율을 증가시키기 위해 최근에는 ZFN, TALEN과 CRISPR/Cas9과 같은 유전자 가위를 적극 활용하고 있다.

Table 1에 제시한 바와 같이 유전자 가위를 이용한 최초의 knock-out 형질전환가축은 2011년 Yang 등에 의하여 보고되었다(Yang 등, 2011). 그들은 심장혈관계 질병 모델 돼지를 개발하기 위하여 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) 유전자를 돼지 체세포에서 ZFN을 이용하여 knock-out한 후 SCNT 방법에 의하여 돼지를 개발하였다. 그 후 ZFN을 이용하여 GGTA1 유전자가 knock-out된 장기이식용 복제돼지가 생산되었다고 보고하였으며(Hauschild 등, 2011), 2014년 도에도 다른 그룹에서 동일한 유전자에 대해서 ZFN을 이용하여 knock-out된 돼지를 개발하였다고 보고하였다(Bao 등, 2014). 그러나 이들은 돼지 체세포에서 GGTA1 유전자에 대한 ZFN에

Table 1. A selective list of gene knock-out and knock-in livestock for the different methods

Genome editor	Gene targeting type	Methods SCNT or CMI	Locus of gene	Species	Reference
ZFN	Knock-out	SCNT	PPAR γ	Pig	Yang et al. (2011)
		SCNT	GGTA1	Pig	Hauschild et al. (2011)
		SCNT	BLG	Bovine	Yu et al. (2011)
	Knock-in	SCNT	MSTN	Bovine	Luo et al. (2014)
		SCNT	GGTA1	Pig	Bao et al. (2014)
		SCNT	CMAH	Pig	Kwon et al. (2013)
TALEN	Knock-out	SCNT	CSN2	Bovine	Liu et al. (2013)
		SCNT	CSN2	Bovine	Liu et al. (2014)
		SCNT	LDLR	Pig	Carlson et al. (2012)
		CMI	MSTN	Bovine	Proudfoot et al. (2015)
		CMI	MSTN	Sheep	Proudfoot et al. (2015)
	Knock-in	SCNT	POLLED	Bovine	Carlson et al. (2016)
		CMI	BLG	Bovine	Wei et al. (2018)
		SCNT	Between MAT1A and SFTPA1	Bovine	Wu et al. (2015)
		SCNT	BLG	Goat	Cui et al. (2015)
		SCNT	SLA-1,2,3	Pig	Reyes et al. (2014)
CRISPR/Cas9	Knock-out	SCNT	MSTN	Goat	Ni et al. (2014)
		CMI	vWF	Pig	Hai et al. (2014)
		CMI	MSTN	Goat	Wang et al. (2015)
		CMI	FGF5		
		CMI	MSTN	Rabbit	Lv et al. (2016)
		CMI	CD163	Pig	Whitworth et al. (2016)
	Knock-in	SCNT	GGAT1, CMAH, B4GalNT2,	Pig	Butler et al. (2016)
		CMI	NANOS2	Pig	Park et al. (2017)
		CMI	CD163	Pig	Burkard et al. (2017)
		SCNT	Between FSCN1 and ACTB	Bovine	Gao et al. (2017)
		SCNT	CCR5	Goat	Li et al. (2019)

ZFN, zinc-finger nucleases; TALEN, transcription activator-like effector nucleases; CRISPR/Cas9, clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/Cas9; SCNT, somatic cell nuclear transfer; CMI, cytoplasmic microinjection.

의한 knock-out 효율은 1-4%로 낮았으나 biallelic knock-out 세포도 확보될 수 있음을 보고하였다. 또한 2011년 Yu 등은 소의 체세포에 *beta-lactoglobulin (BLG)*을 절단할 수 있는 ZFN를 도입하여 knock-out된 체세포를 확보한 후 SCNT에 의하여 소 *BLG* 유전자가 knock-out된 소를 생산하였다(Yu 등, 2011). 그리고 *Myostatin (MSTN)*이 biallelic으로 변이된 형질전환 소가 체세포에 ZFN의 도입과 SCNT 방법에 의하여 생산되었으며, 체세포에서 *MSTN*의 knock-out 효율은 20%로 보고되었다(Luo 등, 2014).

한편 ZFN를 이용한 knock-in은 *CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH)* 유전자가 knock-out된 장기이식용 복제돼지 생산에 적용되었다(Kwon 등, 2013). 연구자들은 789 bp의 5' 상동영역과 763 bp 3' 상동영역으로 구성되고 *PGK-neo-polyA* 유전자가 엑손 8의 위치에 삽입될 수 있는 벡터를 ZFN와 함께 돼지 체세포에 도입하여 30.4%의 knock-in 효율을 얻었으며 이들 세포를 이

용하여 SCNT에 의하여 *CMAH* 유전자가 knock-out된 형질전환 돼지를 생산하였다고 보고하고 있다(Kwon 등, 2013). 또한 소에서도 ZFN를 이용하여 knock-in 형질전환 소를 생산하였다고 보고하고 있다. 2013년 Liu 등은 소 체세포의 *beta-casein (CSN2)* 유전자의 인트론 2의 위치에 ZFN 또는 ZFNicase을 이용하여 *lysostaphin* 유전자가 스플라이싱 사이트를 이용하여 발현할 수 있는 knock-in 세포를 확보하고 SCNT에 의하여 knock-in 소를 생산하였다고 보고하였다(Liu 등, 2013). 연구자들은 소 우유에서 *lysostaphin*이 분비되는 것을 확인하였으며 in vitro assay에서 황색포도상구균이 사멸함을 확인하였다고 보고하여 형질전환 knock-in 소는 기능할 것으로 추정하였다(Liu 등, 2013). 또한 위의 연구와 유사하게 ZFN와 knock-in 벡터를 이용하여 소 *beta-casein (CSN2)* 유전자의 인트론 2의 위치에 *human lysozyme*이 발현할 수 있는 형질전환 knock-in 소가 개발되었으며 이 형질전환 소는 유방염에 저항성이 있을 것으로 생각된다고 보

고하였다(Liu 등, 2014).

2세대 유전자 가위인 TALEN을 이용해서도 knock-out 또는 knock-in 가축이 보고되고 있다. Carlson 등은 2012년 TALEN을 이용하여 *LDL receptor*가 knock-out된 형질전환 돼지를 개발하였다고 보고하였다(Carlson 등, 2012). 연구자들은 LDL receptor를 target 하는 TALEN을 체세포 또는 수정란에 도입하여 각각 64%와 75%의 knock-out 효율을 보고하고 있으며 체세포에서는 mono-allelic이 54%, biallelic이 17%로 확인되었다고 보고하고 있으며, 이러한 *LDLR* knock-out 모델 돼지는 가족성 고콜레스테롤 혈증의 모델로 이용 가능할 것으로 보고하였다(Carlson 등, 2012). *MSTN* 유전자의 knock-out 소와 양의 생산에도 TALEN이 이용되었으며 소에서 ovum pickup - IVF - zygote microinjection 방법을 이용하여 TALEN을 수정란에 미세주입하였을 때 태어난 산자의 75%에서 *MSTN* 유전자가 knock-out된 것으로 확인되었으며 양에서도 유사한 방법을 이용하였을 경우 태어난 산자의 11%가 *MSTN* 유전자에서 변이가 있는 것으로 보고하고 있다(Proudfoot 등, 2015). 또한 뿔없는 소는 Carlson 등에 의해 2016년에 TALEN을 수정란에 미세주입하여 *POLLED* 유전자를 knock-out 함으로써 생산되었다(Carlson 등, 2016). 또한 우유에서 주요 알레르기 유발항원인 *beta-lactoglobulin (BLG)*을 knock-out한 knock-out 소가 개발되었다(Wei 등, 2018). 연구자들은 TALEN을 수정란에 미세주입한 후 biopsy한 할구를 분석하고 knock-out이 확인된 13개의 수정란을 대리모에 이식하여 3마리의 형질전환 송아지를 생산하였다고 보고하였다(Wei 등, 2018).

그리고 TALEN에 의하여 knock-out 형질전환 가축뿐 아니라 knock-in 가축도 생산되고 있다. 2015년 Wu 등은 소 결핵 저항성 증가를 위하여 소의 *MAT1A*와 *SFTPA1* 유전자 사이에 SP110 nuclear body protein을 생산하는 knock-in 소를 생산하였다고 보고하였다(Wu 등, 2015). 이들은 TALEN과 knock-in 벡터인 donor DNA를 체세포에 도입하고 knock-in 세포를 선별한 다음 SCNT 방법에 의하여 생산하였다(Wu 등, 2015). 또한 TALEN에 의하여 유도된 knock-in 양도 개발되었다고 보고하고 있다(Cui 등, 2015). 연구자들은 양 체세포의 *BLG* 유전자 위치에 *human lactoferrin*이 knock-in된 체세포를 이용하고 SCNT 방법에 의하여 형질전환 양을 생산하였다고 보고하였다(Cui 등, 2015).

최근에는 3세대 유전자 가위인 CRISPR/Cas9을 이용하여 형질전환 가축이 생산된 보고가 증가하고 있다. CRISPR/Cas9을 이용한 knock-out 돼지는 2014년 Reyes 등에 의하여 보고되었으며, *MHC class I*이 결핍된 돼지를 생산하기 위하여 *SLA-1,2,3* 유전자가 CRISPR/Cas에 의하여 knock-out된 체세포를 확보한 후 SCNT 방법에 의하여 생산되었다(Reyes 등, 2014). *MSTN* knock-out goat도 CRISPR/Cas9과 SCNT 방법에 의하여 개발되었으며 CRISPR/Cas9을 이용하여 염소 체세포에서 biallelic 세포를 확보할 효율이 59%라고 보고하고 있다(Ni 등, 2014).

*von Willebrand disease (vWD)*에 대한 돼지 모델을 개발하기 위하여 Hai 등(2014)은 *vWF* 유전자를 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 knock-out 하였다(Hai 등, 2014). 이들은 기존의 유전자가위와 SCNT를 연계한 방법을 이용하지 않고 직접 12.5 ng/uL sgRNA와 125 ng/uL Cas9 mRNA를 수정란에 2-10 pL 주입하여 수정란에서의 유전자 편집을 시도하여 태어난 산자의 68.8%에서 유전자 편집에 의하여 knock-out이 된 것으로 보고하였다(Hai 등, 2014). 또한 CRISPR/Cas9 시스템을 1세포기 수정란에 미세주입하여 *MSTN*과 *FGF5* 유전자가 단독 또는 함께 knock-out된 goat을 개발하였다고 보고하고 있으며, *MSTN* knock-out goat는 15%, *FGF5* knock-out goat는 21%, 두 유전자가 모두 knock-out된 경우는 10%라고 보고하고 있다(Wang 등, 2015). 토끼에서도 sgRNA와 Cas9 mRNA를 수정란에 미세주입하는 방법을 이용하여 *MSTN* 유전자가 knock-out된 형질전환 토끼를 개발하였다고 보고하고 있으며 수정란에서 전체 변이율은 83.3%였지만 biallelic 변이율은 25%라고 보고하였다(Lv 등, 2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (돼지 생식기호흡증후군 바이러스)에 저항성 있는 돼지를 개발하기 위하여 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 개발되었으며(Whitworth 등, 2016), 장기이식용 복제돼지를 생산하기 위하여 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 동시에 3가지 유전자인 *GGAT1*, *CMAH*, *B4GalNT2*가 knock-out된 체세포를 확보하고 이 세포를 이용한 SCNT로 3개의 유전자가 knock-out된 형질전환돼지를 보고하고 있다(Butler 등, 2016). 그리고 sgRNA와 Cas9 mRNA를 수정란에 주입하여 SCNT 보다 다소 수월하게 연구가 진행되면서 2017년도에 *NANOS2*와 *CD163* 유전자가 knock-out된 돼지가 각각 개발되었다(Burkard 등, 2017; Park 등, 2017).

CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 knock-out 형질전환가축이 다소 생산되고 있으나 knock-in 가축 생산에 대해서는 많은 보고가 없는 실정이다. Gao 등은 2017년에 CRISPR/Cas9 시스템과 *natural resistance-associated macrophage protein-1* 유전자(*NRAMP1*) donor DNA를 체세포에 도입하여 *FSCN1*와 *ACTB* 유전자 사이에 knock-in을 유도한 다음 이들 세포를 이용하여 SCNT에 의하여 knock-in 형질전환 소를 개발하였다(Gao 등, 2017). Cashmere 생산 모델 goat를 생산하기 위하여 *CCR5 (chemokine receptor 5)* 유전자 위치에 *Thymosin beta 4 (Tβ4)* 유전자가 knock-in된 양이 CRISPR/Cas9 시스템과 연계된 SCNT 방법에 의하여 개발되었으며, 이들은 체세포에서 knock-in 효율은 6.2%라고 보고하였다(Li 등, 2019).

유전자 가위를 이용한 형질전환가축의 생산은 ZFN을 이용한 방법에서 TALEN 방법을 거쳐 현재는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 생산되는 형질전환 가축의 양이 증가하고 있는 실정이다. 또한 유전자 가위를 이용한 knock-out 동물의 생산은 고전적 방법보다 그 효율이 증가와 편리성 등에 의하여 가축에서도 유전자 가위를 이용하여 다양한 목적의 형질전환 knock-out 가축이 생

산되고 있다. 유전자 가위를 이용한 초기에는 유전자 가위를 체세포에 도입한 후 knock-out된 체세포를 확보한 후 SCNT에 의하여 가축을 생산하였으나, 현재는 돼지, 소 등과 같은 일부 가축의 수정란에 유전자 가위를 미세주입하여 SCNT 방법보다 보다 수월하게 knock-out 가축을 생산하고 있다. 그러나 knock-in 형질 전환 가축은 knock-out 보다 적은 수가 보고되고 있으며 ZFN, TALEN과 CRISPR/Cas9 어떤 유전자 가위를 이용하여도 체세포에서 우선 knock-in을 시도한 다음 세포를 선별하고 SCNT 방법에 의하여 knock-in 가축을 생산하고 있는 실정이다.

Liu 등(2013)은 ZFN nickase와 ZFN를 이용하여 소 β -casein 위치에 *lysostaphin*이 발현하는 knock-in 형질전환소를 생산하였을 때 체세포에서 knock-in 효율은 각각 4.5%, 21.4%로 보고하였다(Liu 등, 2013). 또한 ZFN를 이용하여 소 β -casein 위치에 인간 *lysozyme*이 발현하는 젖소를 생산하였을 때 소의 체세포에서 ZFN를 이용하지 않았을 때는 상동재조합이 발생하지 않았지만 ZFN를 이용하였을 때는 12.8-18.5%의 효율로 상동재조합이 발생하였다고 보고하고 있다(Liu 등, 2014). CRISPR/Cas9을 사용하더라도 돼지 체세포의 *Oct4* 유전자 위치에 *tdTomato reporter* 유전자를 knock-in 하는데 있어서 상동재조합에 의한 knock-in효율은 낮은 것으로 보고되고 있다(Lai 등, 2016).

그러나 마우스의 수정란에서 16 kb의 knock-in donor 벡터와 CRISPR/Cas9을 함께 미세주입하여 *rosa26* locus에 knock-in했을 때 knock-in 산자를 얻은 효율은 16-20%로 보고되었다(Chu 등, 2016). 많은 연구자들은 knock-in 효율을 증진하기 위해 여러 가지 방안을 고안하고 있다. 유전자 가위를 사용하지 않은 고전적 방법에 있어서 Knock-in 벡터의 상동영역 길이에 따라 상동재조합의 효율이 다른 것으로 보고되고 있다(Klymiuk 등, 2010). 초기 유전자적중 연구에서는, 상동영역의 길이는 5-8 kb가 적당하고 적어도 1 kb 이상이 되도록 권장되었고, 상동영역의 길이가 1 kb 미만일 때는 상동재조합의 정확성이 감소한다고 보고되었다(Thomas 등, 1992). 하지만 유전자가위의 이용으로 100 bp에서부터 수 kb의 상동영역 길이가 유전자 편집에 성공적으로 사용되었다고 보고되었다(Urnov 등, 2005; Byrne 등, 2015; Howden 등, 2015; Maruyama 등, 2015). 실제로 *zebrafish*에서 CRISPR/Cas9시스템을 이용하고 0, 10, 20과 40 bp의 다른 상동영역을 포함하는 insertion knock-in 벡터를 이용해 유전자적중을 했을 때, 40 bp의 상동영역 길이를 사용했을 때 77%의 integration효율로 가장 높았고, 상동영역의 길이가 0 bp일 때는 integration이 발생하지 않았다고 보고되었다(Hisano 등, 2015). 또한 마우스에서도 CRISPR/Cas9시스템을 사용하여 유전자적중을 했을 때, 500 bp의 상동영역 길이를 포함하는 벡터를 사용했을 때는 2-12%의 효율로 상동재조합이 일어났지만, 250 bp와 60 bp의 상동영역 길이를 포함하는 벡터를 사용했을 때는 상동재조합이 발생하지 않은 것으로 보고되었다(Raveux 등, 2017).

다른 방안으로는, 연구자들은 homologous recombination을

증가시키는 RAD51-stimulatory compound 1 (RS-1)을 처리하여 유전자적중 효율을 높이고자 시도하고 있다. RS-1은 RAD51의 발현을 조절하여 상동유전자 재조합을 증가시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Jayathilaka 등, 2008). CRISPR/Cas9을 사용하여 HEK293 (human embryonic kidney)세포와 U2OS (human bone osteosarcomaepithelial)세포에서 유전자적중을 했을 때 RS-1을 처리하지 않은 것 보다 처리 하였을 때 4배 정도 insertion효율이 높았다고 보고되었다(Pinder 등, 2015). 또한 RS-1을 처리하고 TALEN이나 CRISPR/Cas9을 이용해 토끼 embryo에 유전자적중을 할 때 각각 17.6%와 26.3%의 knock-in효율로 RS-1을 처리하지 않았을 때보다 knock-in효율이 3-4배 증가했다고 보고되었다(Song 등, 2016).

또한 연구자들은 세포에 HDAC inhibitor를 처리하여 chromatin 구조 변경을 유도함으로써 상동재조합에 따른 유전자적중 효율을 증가시키고자 노력하고 있다(Aymard 등, 2014). HDAC inhibitor는 G2/M기를 지연시키고 G1기를 촉진시켜 NHEJ를 감소하고 HR을 증가시킨다고 보고되었다(Noh 등, 2009). 실제로, TALEN이나 CRISPR/Cas9 유전자가위를 이용하여 인간 배아줄기세포와 유도만능줄기세포에 HDAC inhibitor인 valproic acid를 처리하고 RAD51 유전자를 과발현하여 다양한 target site에서 상동유전자 재조합에 의한 유전자적중효율을 증가시켰다고 보고되었다(Takayama 등, 2017). Valproic acid를 처리한 세포에 6.5 kb 또는 7.58 kb의 knock-in 벡터 또는 RAD51을 도입하였을 때, valproic acid의 처리로 2.6배 증가하였고, valproic acid의 처리와 RAD51을 함께 도입하였을 때는 유전자적중 효율이 4배가량 증가하였다고 보고되었다(Takayama 등, 2017). 이러한 효율 증진에 대한 연구를 진행하고 있음에 불구하고 현재까지 보고된 논문 중 소의 체세포나 수정란에서 CRISPR/Cas9시스템을 이용한 유전자적중의 효율에 관한 논문은 거의 없는 실정이다.

결론과 향후방향(미래 예측)

현재까지 유전자 가위를 이용하고 가축에서 knock-out 형질 전환 가축은 생산되고 있으나 knock-in 가축의 생산은 저조한 실정이다. 특히 mouse에서는 전핵기 수정란에 유전자가위와 donor DNA인 knock-in 벡터를 함께 주입하여 유전자 편집 mouse가 생산되고 있으나 가축에서는 보고되고 있지 않다. 유전자 가위를 이용하면서 유전자적중 효율이 증가되었지만, 여전히 가축에서는 knock-in 효율이 낮은 것이 현실적이다. 특히 수정란에 유전자 가위와 knock-in 벡터를 함께 주입하여 보다 효율적으로 형질전환 가축을 생산할 수 있는 시스템이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(No. 316037-4).

ORCID

Da Som Park: <https://orcid.org/0000-0002-0159-4571>
 Soseob Kim: <https://orcid.org/0000-0003-1846-130X>
 Deog-Bon Koo: <https://orcid.org/0000-0001-7825-9598>
 Man-Jong Kang: <https://orcid.org/0000-0002-7628-0614>

REFERENCES

- Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, Iacovoni JS, Daburon V, Miller KM, Jackson SP, Legube G. 2014. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double strand breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 21(4):366-374.
- Bao L, Chen H, Jong U, Rim C, Li W, Lin X, Zhang D, Luo Q, Cui C, Huang H, Zhang Y, Xiao L, Fu Z. 2014. Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci.* 57(2):263-268.
- Bollag RJ, Waldman AS, Liskay RM. 1989. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet.* 23:199-225.
- Brandon EP, Idzerda RL, McNight GS. 1995. Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts. *Current Biol.* 5(7):758-765.
- Burkard C, Lilloco SG, Reid E, Jackson B, Mileham AJ, Ait-Ali T, Whitelaw CB, Archibald AL. 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog.* 13(2):e1006206.
- Butler JR, Martens GR, Estrada JL, Reyes LM, Ladowski JM, Galli C, Perota A, Cunningham CM, Tector M, Joseph Tector A. 2016. Silencing porcine genes significantly reduces human-anti-pig cytotoxicity profiles: an alternative to direct complement regulation. *Transgenic Res.* 25(5):751-759.
- Byrne SM, Ortiz L, Mali P, Aach J, Church GM. 2015. Multi-kilo base homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 43(3):e21.
- Carlson DE, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC. 2016. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol.* 34(5):479-481.
- Carlson DE, Tan W, Lilloco SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(43):17382-17387.
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39(12):e82.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 186(2):757-761.
- Chu VT, Weber T, Graf R, Sommermann T, Petsch K, Sack U, Volchkov P, Rajewsky K, Kühn R. 2016. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygote. *BMC Biotechnol.* 16:4.
- Clark AJ. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 3:337-350.
- Clark AJ, Burl S, Denning C, Dickinson P. 2000. Gene targeting in livestock: A preview. *Transgenic Res.* 9(4-5):263-275.
- Cui C, Song Y, Liu J, Ge H, Li Q, Huang H, Hu L, Zhu H, Jin Y, Zhang Y. 2015. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep.* 5:10482.
- Dai Y, Vaught TD, Boone V, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol.* 20:251-255.
- Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmot I, Clark AJ. 2001. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl transferase(GGTA1) gene and the prion protein(PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol.* 19(6):559-562.
- Denning C, Priddle H. 2003. New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction.* 126:1-11.
- Doetschman T, Maeda N, Smithies O. 1998. Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8583-8587.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31:397-395.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q, Cui C, Liu X, Zhang J, Zhang Y. 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol.* 18(1):13.
- Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 24(3):372-375.
- Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(29):12013-12017.

- Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, Okamoto H, Yamam T. 2015. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep*. 5:8841.
- Houdebine LM. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*. 9:305-320.
- Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32:107-121.
- Howden SE, Maufort JP, Duffin BM, Elefanty AG, Stanley EG, Thomson JA. 2015. Simultaneous reprogramming and gene correction of patient fibroblasts. *Stem Cell Rep*. 5:1109-1118.
- Jasin M, Moynahan ME, Richardson C. 1996. Targeted transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:8804-8808.
- Jayathilaka K, Sheridan SD, Bold TD, Bochenska K, Logan HL, Weichselbaum RR, Bishop DK, Connell PP. 2008. A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15848-15853.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(3):1156-1160.
- Klymiuk N, Aigner B, Brem G, Wolf E. 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev*. 77(3):209-221.
- Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hageman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, Smithies O. 1989. Germline transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(22):8927-8931.
- Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, Brown AN, Kim JH, Samuel M, Mao J, Park KW, Murphy CN, Prather RS, Kim JH. 2013. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep*. 3:1981.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein CJ, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 295:1089-1092.
- Lai S, Wei S, Zhao B, Ouyang Z, Zhang Q, Fan N, Liu Z, Zhao Y, Yan Q, Zhou X, Li L, Xin J, Zeng Y, Lai L, Zou Q. 2016. Generation of knock-in pigs carrying Oct4-tdTomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS ONE*. 11(1):e0146562.
- Ledermann B. 2000. Embryonic stem cells and gene targeting. *Exp Physiol*. 85:603-613.
- Li X, Hao F, Hu X, Wang H, Dai B, Wang X, Liang H, Cang M, Liu D. 2019. Generation of T β 4 knock-in Cashmere goat using CRISPR/Cas9. *Int J Biol Sci*. 15(8):1743-1754.
- Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y. 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lyso-staphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun*. 4:2565.
- Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, Su F, Pan S, Luo Y, Guo Z, Quan F, Zhang Y. 2014. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci*. 281(1780):20133368.
- Luo J, Song Z, Yu S, Cui D, Wang B, Ding F, Li S, Dai Y, Li N. 2014. Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 9(4):e95225.
- Lv Q, Yuan L, Deng J, Chen M, Wang Y, Zeng J, Li Z, Lai L. 2016. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci Rep*. 6:25029.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 9(6):467-477.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. 2008. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*. 7(18):2902-2906.
- Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of non homologous end joining. *Nat Biotechnol*. 33:538-542.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*. 405(6790):1066-1069.
- McVey M, Lee SE. 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*. 24(11):529-538.
- Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C. 2014. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*. 9(9):e106718.
- Noh EJ, Lim DS, Jeong G, Lee JS. 2009. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G2/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 378(3):326-331.
- Park KE, Kaucher AV, Powell A, Waqas MS, Sandmaier SE, Oatley MJ, Park CH, Tibary A, Donovan DM, Blomberg LA, Lillo SG, Whitelaw CB, Mileham A, Telugu BP, Oatley JM. 2017. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci Rep*. 7:40176.
- Park TS. 2019. Current strategies of genomic modification in livestock and applications in poultry. *J Anim Reprod Biotechnol* 34:65-69.
- Petersen B. 2017. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod Domest Anim*. 3:4-13.
- Piedrahita JA. 2000. Targeted modification of the domestic animal genome. *Theriogenology*. 53:105-116.
- Pinder J, Salsman J, Delleira G. 2015. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res*. 43(19):9379-9392.

- Proudfoot C, Carlson DE, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, Lilloco SG, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.* 24(1):147-153.
- Raveux A, Vandormael-Pournin S, Cohen-Tannoudji M. 2017. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Sci Rep.* 7:42661.
- Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, Blosser RJ, Smith RF, Sidner RA, Paris LL, Blankenship RL, Ray CN, Miner AC, Tector M, Tector AJ. 2014. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol.* 193(11):5751-5757.
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. 2007. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology.* 67:127-133.
- Sakuma T, Woltjen K. 2014. Nuclease-mediated genome editing: At the front-line of functional genomics technology. *Dev Growth Differ.* 56:2-13.
- Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 32(4):347-355.
- Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ. 1989. Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science.* 246:799-803.
- Sedivy JM, Vogelstein B, Liber HL, Hendrickson EA, Rosmarin A. 1999. Gene targeting in human cells without isogenic DNA. *Science.* 283.
- Shen W, Lan G, Yang X, Li L, Min L, Yang Z, Tian L, Wu X, Sun Y, Chen H, Tan J, Deng J, Pan Q. 2007. Targeting the exogenous htPam gene on goat somatic cell beta-casein locus for transgenic goat production. *Mol Reprod Dev.* 74:428-434.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* 317(6034):230-234.
- Song J, Yang D, Xu J, Zhu T, Chen YE, Zhang J. 2016. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun.* 7:10548.
- Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. 2017. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res.* 45(9):5198-5207.
- Taleei R, Nikjoo H. 2013. The non-homologous end-joining (NHEJ) pathway for the repair of DNA double-strand breaks: I. A mathematical model. *Radiat Res.* 179(5):530-539.
- Tan W, Proudfoot C, Lilloco SG, Whitelaw CB. 2016. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res.* 25(3):273-287.
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51(3):503-512.
- Thomas KR, Deng C, Capecchi MR. 1992. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol.* 12:2919-2923.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282(5391):1145-1147.
- Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc finger nucleases. *Nature.* 435:646-651.
- Wang B, Zhou J. 2003. Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:103.
- Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, Dong Z, Niu Y, Shi B, Cai B, Liu J, Huang S, Yan H, Zhao X, Zhou G, He X, Chen X, Yang Y, Jiang Y, Shi L, Tian X, Wang Y, Ma B, Huang X, Qu L, Chen Y. 2015. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 5:13878.
- Wei J, Wagner S, Maclean P, Brophy B, Cole S, Smolenski G, Carlson DE, Fahrenkrug SC, Wells DN, Laible G. 2018. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Sci Rep.* 8(1):7661.
- Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS. 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol.* 34(1):20-22.
- Wolf E, Scherthaner W, Zakhartchenko V, Prelle K, Stojkovic M, Brem G. 2000. Transgenic technology in farm animals - progress and perspectives. *Exp Physiol.* 85:615-625.
- Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M Lv J, Liu J, Zhang Y. 2015. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(13):E1530-1539.
- Wyman C, Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet.* 40:363-383.
- Yáñez RJ, Porter AC. 1998. Therapeutic gene targeting. *Gene Ther.* 5(2):149-159.
- Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L. 2011. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res.* 21(6):979-982.
- Yang H, Wang H, Jaenisch R. 2014. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 9(8):1956-1968.
- Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* 21(11):1638-1640.