

돼지 형질전환 체세포에서 pWAP promoter 영역에서의 DNA 메틸화 비교

박미령*, 이해선, 오건봉
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과

DNA methylation change of pWAP promoter region in porcine transgenic somatic cells

Mi-Ryung Park*, Haesun Lee, Keon Bong Oh
Division of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Science, RDA

요약 DNA methylation는 포유동물에 있어 세포 기능 및 유전자의 안정화 조절로 생명을 유지하는 역할을 한다. 본 연구에서는 돼지 귀조직 유래 섬유아 세포에 돼지 유청 단백질과 사람 조직 플라스미노겐 벡터를 도입하여 메틸레이션 영역에 따른 변화를 비교 분석하였다. pWAP promoter 내 메틸레이션 패턴을 분석하기 위하여 동일한 passage 단계에 있는 세포를 배양하여 채취하였으며, bisulfite sequencing 방법으로 분석을 진행하였다. 그 결과 pWAP promoter 내 upstream 영역 두 부분에서 CpG islands가 있음을 확인하였다. pWAP promoter를 도입한 세포의 경우 5 region의 유전자 도입 그룹에서 유의적으로 메틸레이션 패턴이 높게 나타남을 확인하였다. 또한, htPA 벡터를 도입한 세포의 경우 htPA1_4 그룹에서 유의적으로 높은 메틸레이션이 확인되었다. 메틸레이션 양상은 CpG islands 영역과 구축된 세포주에 따라 각기 다르게 나타남을 확인하였다. 이러한 결과는 프로모터 선별 및 세포주 구축이 형질전환 동물을 생산하는 데 있어 중요하게 작용할 수 있을 것으로 여겨지며, 유전자의 기능에 대한 연구에도 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract DNA methylation is vital in maintaining genomic stability and modulating cellular functions in mammalian cells. This study was performed to identify the differentially methylated region (DMR) in porcine whey acid protein (pWAP) and the human tissue plasminogen activator (htPA) vector of porcine ear fibroblast cells. To investigate the methylation patterns of the WAP promoter, cells were collected from the same passage and analyzed by the bisulfite sequencing method. Results showed that two cytosine-guanine dinucleotide (CpG) islands are present in the promoter region of pWAP. The methylation level of the CpG island 5 region was significantly higher in the pWAP transfected somatic cells than in the wild type (WT) somatic cells. In the htPA, transgenic cells were significantly higher in htPA1_4 cells than the other htPA transfected cells. The changing methylation pattern was observed in the promoter regions and established transgenic cell lines. Our data indicate that promoter selection and cell line construction can play an important role in the production of transgenic animals. Thus, these results can be used as basic data for research on the function of genes.

Keywords : DNA Methylation, PWAP Promoter, Somatic Cells, Porcine

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01097602)의 지원에 의해 이루어진 것임.

*Corresponding Author : Mi-Ryung Park(National Institute of Animal Science)
email: mrpark45@korea.kr

Received November 5, 2021

Revised November 22, 2021

Accepted December 6, 2021

Published December 31, 2021

1. 서론

형질전환 동물 생산 기술은 생명공학 분야에서 아주 빠르게 성장하고 있다. 특히 유전자 제작 기술을 통하여 외래 유전자를 동물의 genome 내에 삽입시켜 목적으로 하는 유전자가 발현되고 후대에도 지속적으로 전달 되게 된다. 형질전환 동물 생산 기술은 단순 실험동물이 아닌 가축에도 적용되고 있으며[1], 특히 돼지는 사람과 가장 유사하여 질병 연구에 활용뿐만 아니라 이종장기 이식 및 신약 물질 생산 등을 연구하는데 가치 있는 동물로 주목 받고 있다[2-5]. 최근 형질전환 동물 생산 기술이 고도화 되면서, 국내·외에서 다양한 종류의 유용 생리활성 물질 생산뿐만 아니라 질환 모델 등 형질전환 동물이 개발 되었다[6-11]. 유전자 조작 기술이 많이 향상 되었음에도 불구하고 형질전환을 진행하는 데 있어서는 여전히 많은 제한점이 있다. 많은 연구에서 보고된 바와 같이 외래 유전자를 도입한 경우 목적으로 하는 유전자의 발현이나 inheritance가 제한적으로 일어나는 것이 관찰되기도 하였다[12-15]. 대부분의 경우 체세포 내 도입된 외래유전자의 발현이 배양 기간에 따라 현저히 낮아지는 경향을 나타내었고[13], 형질전환 동물의 경우 후대까지 안정적으로 전달되지 않는다는 결과도 보고된 바 있다[16]. 따라서, 형질전환 동물에서 안정적으로 타겟 유전자를 발현하는 개체를 선택하고 확립하는 데 어려움이 있다[14]. 도입된 외래 유전자의 안정성을 높이기 위한 원인 규명에 대한 연구들이 진행 되고 있으며, 그 중 하나로 DNA methylation이 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다[17]. DNA methylation은 유전자 발현에 있어 transcriptional inactivity로 silencing을 일으키는 요인 중 하나로 밝혀지기도 하였다[18-20]. 따라서, 본 연구에서는 돼지 WAP 프로모터를 이용하여 htPA(human tissue plasminogen activator) 유전자가 발현 되도록 벡터를 제작한 후 세포 내 도입하여 DNA methylation pattern 변화를 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시축

본 실험에 공시된 돼지는 랜드레이스와 요크셔 교잡종인 일반돼지를 이용하였으며, 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다.

2.2 체세포 배양 및 유전자 도입

체세포 배양은 출생 후 일주일령 암컷 자돈의 귀 조직을 채취하여 이용하였다. 체세포 배양은 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 10% Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)와 1% Antibiotic/antimycotic (Invitrogen)을 첨가 후 실시하였다[21].

유선특이적 프로모터 벡터(pWAP)와 유선특이적 프로모터에 htPA 유전자가 삽입된 벡터(htPA)를 electroporation으로 각각 세포에 도입하였다. 도입된 세포는 24시간 배양 후 형질전환 세포만을 선별하기 위하여 600ug/mL G418(Gibco)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

2.3 Bisulfite 처리 및 PCR 분석

Genomic DNA(gDNA)는 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)을 이용하여 분리 후 농도를 측정하였다. 준비된 gDNA는 EpiJET bisulfite conversion kit (Thermo scientific)를 이용하여 bisulfite conversion을 진행하였다. 이때 200ng의 gDNA를 사용하였으며, bisulfite conversion을 위하여 98℃에서 10분, 60℃에서 150분 동안 처리하였다[22]. 최종 반응이 완료된 DNA는 Epitaq HS (TAKARA)와 Table 1에 작성된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 크기와 증폭유무를 확인하였다.

Table 1. The primer sequence for PCR amplification

CpG island	Sequences	Tm	Size(bp)
1 region	F: TGTAGATAGATTGTGTAGGTAGGTAG	53	216
	R: TTATATCTAACCCCTCAATAAACATC		
5 regions	F: AGGGGGAGATTATGGTAGTTTAAAG	59	256
	R: TCCATAAAAAACAAATTTAATCCC		

2.4 Cloning 및 염기서열 분석

PCR 반응 산물은 pCR2.1 벡터에 TA 클로닝하기 위하여 Gotaq(Promega) 1ul를 첨가 후, 72℃에서 10분 동안 반응하여 A tailing을 진행하였다. A tailing이 된 PCR 산물과 pCR2.1 벡터는 Ligation mix(TAKARA)를

이용하여 ligation을 실시하였다. Plasmid는 QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN)을 사용하여 추출하였다. PCR 산물의 삽입이 확인 된 plasmid를 이용하여 염기 서열을 실시하였으며, 염기서열 분석은 Genetyx 프로그램을 사용하였다[22].

2.5 통계처리

통계처리는 SAS Enterprise Guide 7.1 프로그램의 t test(LSD)를 이용하여 처리구간 유의성 분석을 실시하였다($P < 0.05$, Mean $\pm$ SE).

3. 결과 및 고찰

3.1 돼지 유선 특이적 프로모터와 htPA 발현 벡터 구조 및 메틸레이션 영역 조사

형질전환 세포 생산을 위하여 Fig. 1A와 같이 유전자를 준비하였다. 총 14.2kb로 구성되어 있는 벡터는 유선 특이적 프로모터인 돼지 WAP을 이용하였으며, 타겟 유전자는 htPA가 발현 되도록 하였다 (Fig. 1A). 또한, 메틸레이션 패턴을 분석하기 위하여 Urogene에서 제공하는 프로그램을 이용하여 CpG island 영역을 조사 한 결과 pWAP up stream 영역의 두 부분에서 확인되었다 (Fig. 1B). 1 region은 GC% 56~57 였으며, 14개의 CpG sites를 포함하고 있었다. 5 region의 GC%는 52~64로 나타났으며, 12개의 CpG sites가 있음을 확인하였다. 후생유전적 변화 중의 하나인 DNA 메틸화는

cytosine 염기에 일어나는 것으로 포유동물의 경우 대략 70-80%가 CpG 디뉴클레오티드에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 변화는 유전자 발현 억제와 밀접한 연관이 있으며, 특히 유전자 promoter 영역의 DNA 메틸화로 인하여 유전자 발현이 억제되는 것으로 알려져 있다[23].

3.2 pWAP 벡터 도입 형질전환 체세포에서의 DNA methylation 변화 분석

pWAP 벡터를 도입한 돼지 귀 조직 유래 섬유아 세포에서 promoter 영역의 DNA methylation을 분석한 결과 1 region에서는 WT 과 pWAP 유전자 도입 체세포 그룹에서 (92.9 ± 2.3 vs 98.6 ± 1.4 %) 유의적 차이가 인정되지 않았다 (Fig. 2A). 그러나, 5 region의 경우 WT 그룹과 비교한 결과 유의적으로 낮은 methylation pattern을 보였다 (Fig. 2B, 81.7 ± 4.9 vs 98.3 ± 1.7 %). WT 그룹의 경우 pWAP promoter의 CpG regions에 따라 다른 패턴의 메틸레이션 양상을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 동일한 유전자 내에서도 메틸레이션 영역에 따라 DNA 메틸화 양상이 다르게 나타남을 관찰 할 수 있었다. 프로모터 영역에 메틸화 가변 영역이 존재하며, 특히 생식세포와 생체 조직에 따라 서로 다르게 나타날 뿐만 아니라, 발달단계에 따라서도 메틸화 변화가 현저히 다르게 나타난다고 보고된 바 있다[24]. 따라서 외래 유전자 도입에 따라 각기 다른 영역의 메틸레이션 패턴 변화는 형질전환 동물 생산에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

3.3 htPA를 발현하는 형질전환 체세포에서 DNA methylation 변화 분석

체세포내 htPA 유전자를 도입하여 2개의 형질전환 세포주를 확립하였다. 각 세포주에서 DNA methylation을 비교 한 결과 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 1 region의 경우 htPA1_#3과 htPA1_#4 세포주에서 (74.3 ± 4.3 vs 91.4 ± 1.4 %) 유의적 차이를 확인하였다. 그러나, 5 region 그룹에서는 유의적 차이가 인정되지 않았다(79.9 ± 3.3 vs 71.7 ± 2.0 %). 일반적으로 조직에 따라 메틸레이션 양상은 동일 개체라 하더라도 각기 다르게 나타나는 것은 이미 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 동일한 세포를 사용하여 외래 유전자를 도입 한 경우 구축된 세포주에 따라 메틸레이션 양상이 다르게 나타남을 확인 할 수 있었다.

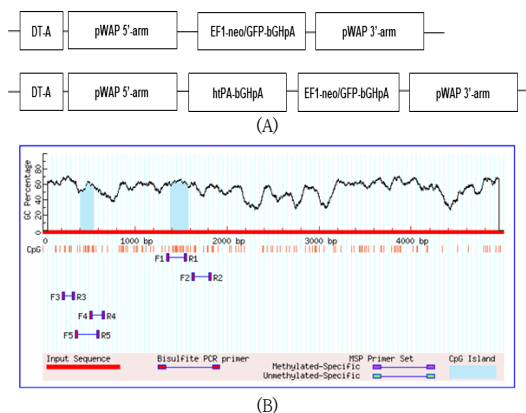


Fig. 1. Constructure of pWAP and htPA vector(A) and analysis of the CpG island region(B). The blue region is the CpG island. CpG, cytosine-guanine dinucleotide.

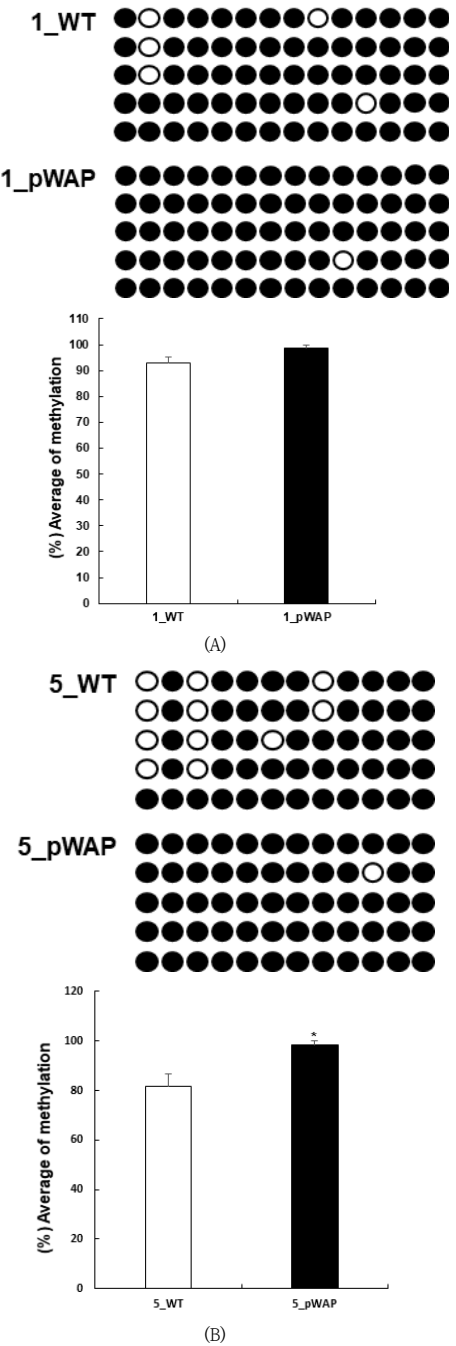


Fig. 2. The methylation pattern of CpG island 1 region(A) and 5 region(B) of pWAP promoter. Every circle represents as CG, black circles mean methylated CG, and white circles mean unmethylated CG. (*P<0.05).

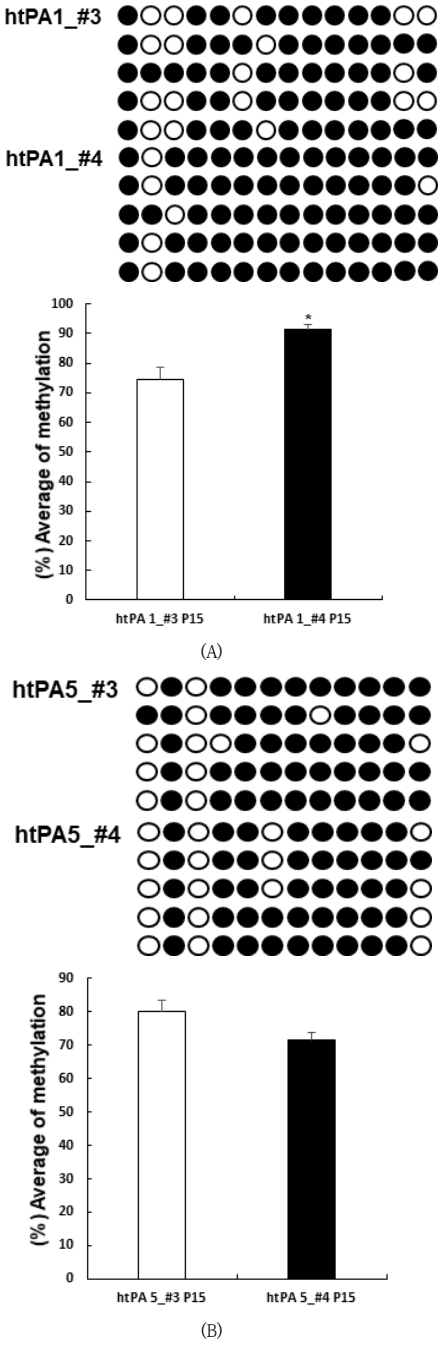


Fig. 3. The methylation pattern of CpG island 1 region(A) and 5 region(B) of htPA vector included wap promoter. Every circle represents as CG, black circles mean methylated CG, and white circles mean unmethylated CG. (*P<0.05)

CpG islands의 메틸레이션은 유전자 조절, 세포 분화, 배 발달 등 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 신약 물질 생산을 위한 형질전환 돼지 생산의 경우 유전 특이적 프로모터를 이용하여 목적 단백질을 유즙 내로 분비 할 수 있도록 하기 위하여 이용되고 있다. 이런 목적으로 사용되고 있는 돼지 WAP promoter의 경우 각 CpG islands의 region에 따라 메틸레이션이 다르게 나타날 수 있으며, 목적 유전자를 삽입한 경우 선별한 세포에 따라 그 양상이 다르게 나타남을 확인 할 수 있었다. 형질전환 동물 생산에 있어 많은 연구자들이 외래 유전자 도입과 아울러 후성 유전학적 변화에 대한 연구를 진행하였다. 비정상적인 메틸레이션의 현상은 쥐와 돼지 그리고 소에서 보고된 바 있으며, 불완전한 메틸레이션 패턴은 유전자 발현에도 영향을 끼쳐 외래유전자의 silencing을 초래하거나 발달에 이상을 일으키는 것으로 나타났다[25-28].

따라서, 형질전환 동물 생산시 타겟 유전자의 안정적인 발현과 정상적인 동물의 발달을 위해서 유전자의 선정 및 체세포 선별이 매우 중요하다고 여겨진다.

4. 결론

본 연구 결과를 바탕으로 돼지 형질전환 체세포에서 DNA 메틸레이션을 분석 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 돼지 유전 특이적 프로모터 영역 내 CpG island는 pWAP upstream 두 부분에서 확인되었다.
- (2) pWAP 벡터 도입 형질전환 체세포에서 DNA methylation을 분석 결과 5 region에서 패턴이 다르게 나타나는 것을 확인하였다.
- (3) htPA 발현 벡터가 도입 된 형질전환 체세포의 경우 구축된 세포주에 따라 다른 패턴의 DNA methylation 양상이 나타남을 확인하였다.

본 연구에서는 유즙 내로 유용한 단백질 생산을 목적으로 WAP 프로모터를 이용하여 목적 유전자를 도입 하는 경우 메틸레이션의 패턴에 영향을 줄 수 있음을 확인 하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 형질전환 돼지 생산을 위하여 WAP 프로모터를 이용하는 경우 목적 유전자의 선별 및 형질전환 체세포의 선택이 중요한 요인으로 작용 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] J. Ruan, Jie. Xu, R. Y. Chen-Tsai, K. Li, "Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry?", *Transgenic Research*, Vol 26, No. 6, pp.715-726, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0049-7>
- [2] M. H. Ji, J. J. Yang, J. R. Wu, Q. G. Li, M. Li, Y. X. Fan, W. Y. Li, "Experimental sepsis in pigs-Effects of vasopressin on renal, hepatic, and intestinal dysfunction." *Upsala Journal of Medical Sciences*, Vol 117, No. 3, pp.257-63, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.650796>
- [3] Y. Yang, M. R. Hayden, S. Sowers, S. V. Bagree, J. R. Sowers, "Retinal redox stress and remodeling in cardiometabolic syndrome and diabetes." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 3, No. 9, pp. 392-403, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.4161/oxim.3.6.14786>
- [4] D. K. C. Cooper, B. Gollackner, D. H. Sachs, "Will the pig solve the transplantation backlog?" *Annual Review of Medicine*, Vol. 53, pp. 133-147, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103900>
- [5] H. G. Lee, H. C. Lee, S. W. Kim, P. Lee, H. J. Chung, Y. K. Lee, J. H. Han, I. S. Hwang, J. I. Yoo, Y. K. Kim, H. T. Kim, W. K. Chang, J. K. Park, "Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs." *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 55, No. 5, pp.484-490, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.20212>
- [6] J. Chen, W. Zeng, W. Pan, C. Pang, J. Zhang, J. Su, W. Long, H. Zhao, X. Zuo, X. Xie, J. Wu, L. Nie, H. Y. Zhao, H. J. Wei, X. Chen, "Symptoms of systemic lupus erythematosus are diagnosed in leptin transgenic pigs." *PLOS Biology*, Vol. 16, No. 8, pp. e2005354, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005354>
- [7] J. K. Park, Y. K. Lee, P. Lee, H. J. Chung, S. KIM, H. G. Seo, M. K. Han, J. H. Park, C. G. Kim, H. T. Kim, Y. K. Min, K. S. Kim, J. H. Lee, W. K. Chang, "Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs." *Journal of Biotechnology*, Vol. 122, No. 3, pp.362-71, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.021>
- [8] K. W. Keiser, J. F. Engelhardt, "New animal models of cystic fibrosis:what are they teaching us?" *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, Vol. 17, No. 6, pp.478-83, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32834b14c9>
- [9] F. Liu, J. Liu, Z. Yuan, Y. Qing, H. Li, K. Xu, W. Zhu, H. Zhao, B. Jia, W. Pan, J. Guo, X. Zhang, W. Cheng, W. Wang, H. Y. Zhao, H. J. Wei, "Generation of GTKO diannan miniature pig expressing human complementary regulator proteins h CD55 and h CD59 via T2A peptide-based bicistronic vectors and scnt." *Molecular Biotechnology*, Vol. 60, pp. 550-62,

2018.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0091-6>
- [10] S. Suzuki, M. Iwamoto, Y. Saito, D. Fuchimoto, S. Sembon, M. Suzuki, S. Mikawa, M. A. Hashimoto, Y. Aoki, Y. Najima, S. Takagi, N. Suzuki, E. Suzuki, M. Kubo, J. Mimuro, Y. Kashiwakura, S. Madoiwa, Y. Sakata, A. C. F. Perry, F. Ishikawa, A. Onishi, "Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs." *Cell Stem Cell*, Vol. 10, No. 6, pp. 753-58, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.021>
- [11] M. S. Lee, "Health literacy and health behaviors among older adults with cardiocerebrovascular disease residing in rural areas." *Korean Journal of Adult Nursing*, Vol. 29, No. 3, pp. 256-65, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.7475/kjan.2017.29.3.256>
- [12] A. N. Gubin, B. Reddy, J. M. Njoroge, J. L. Miller, "Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 236, No. 2, pp.347-50, 1997.
DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6963>
- [13] A. R. Migliaccio, C. Bengra, J. Ling, W. Pi, C. Li, S. Zeng, M. Keskinete, B. Whitney, M. Sanchez, D. Migliaccio, D. Tuan, "Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the green fluorescent protein transgene in K562 cells." *Gene*, Vol. 256, No. 1-2, 197-214, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00353-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00353-X)
- [14] L. M. Houdebine, "Transgenic animal bioreactors." *Transgenic Res*, Vol. 9, pp. 305-20, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008934912555>
- [15] Y. Yamauchi, B. Doe, A. Ajduk, M. A. Ward, "Genomic DNA damage in mouse transgenesis." *Biol Reprod*, Vol. 77, No. 5, pp.803-12, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063040>
- [16] G. Robertson, D. Garrick, M. Wilson, D. I. Martin, E. Whitelaw, "Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse." *Nucleic Acids Res*, Vol. 24, No. 8, pp. 1465-71, 1996.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/24.8.1465>
- [17] D. Garrick, S. Fierring, D. I. K. Martin, E. Whitelaw, "Repeat-induced gene silencing in mammals." *Nature Genet*, Vol. 18, No. 1, pp. 56-9, 1998.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ng0198-56>
- [18] D. Barlow, "Gametic imprinting in mammals." *Science*, Vol. 8, No. 270, pp. 1610-13, 1995.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1610>
- [19] A. Schumacher, P. A. Koetsier, J. Hertz, W. Doerfler, "Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of *de novo* imposed methylation patterns in transgenic mice." *Biol Chem*, Vol. 275, No. 8, pp. 37915-21, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M004839200>
- [20] M. Kearns, J. Preis, M. McDonald, C. Morris, W. Whitelaw, "Complex patterns of inheritance of an imprinted murine transgene suggest incomplete germline erasure." *Nucleic Acids Res*, Vol. 28, No. 17, pp. 3301-9, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.17.3301>
- [21] M. R. Park, G. S. Im, S. W. Kim, S. Hwang, J. H. Park, H. Kim, Y. J. Do, S. B. Park, B. S. Yang, Y.M. Song, J. H. Cho, Y. G. Ko, "Aberrant gene expression patterns in extraembryonic tissue from cloned porcine embryos." *Research in Veterinary Science*, Vol. 94, pp. 531-538, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.004>
- [22] I. S. Hwang, M. R. Park, H. S. Lee, T. U. Kwak, H. Y. Son, J. K. Kang, J. W. Lee, K. Lee, E. W. Park, S. Hwang, "Developmental and deenerative characterization of porcine parthenogenetic fetuses during early pregnancy." *animals*, Vol. 10, pp. 622, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10040622>
- [23] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature*, Vol. 409, No. 6822, pp. 860-921, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1038/35057062>
- [24] P. W. Laird, "Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis." *Nat Rev Genet*, Vol. 11, pp. 191-203, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2732>
- [25] Y. G. Chung, S. Ratnam, J. R. Chaillat, K. E. Latham, "Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos." *Biol Reprod*, Vol. 69, pp. 146-153, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014076>
- [26] M. R. Mann, Y. G. Chung, L. D. Nolen, R. R. Verona, et al., "Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos." *Biol Reprod*, Vol. 69, pp. 902-914, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017293>
- [27] Y. K. Kang, J. S. Park, D. B. Koo, Y. H. Choi, et al., "Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos." *EMBO J*, Vol. 21, pp. 1092-1100, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.109>
- [28] Q. R. Kong, M. L. Wu, Y. J. Huan, L. Zhang, et al., "Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs." *PLoS One*, Vol. 4, pp. -, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006679>

박 미 령(Mi-Ryung Park)

[정회원]



- 2000년 2월 : 경상대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 1월 ~ 2012년 12월 : 건국대 동물자원 전임연구원
- 2013년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉

동물발생, 생명공학

이 해 선(Haesun Lee)

[정회원]



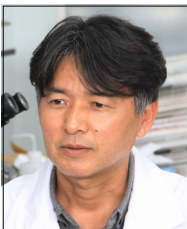
- 2018년 2월 : 전남대학교 농업생명과학대학학연협동과정 (농학석사)
- 2018년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉

분자생물, 유전자 편집, 이종이식

오 건 봉(Keon Bong Oh)

[정회원]



- 1995년 2월 : 충남대학교 축산학과 (농학석사)
- 2000년 2월 : 충남대학교 축산학과 (농학박사)
- 2008년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사교수

〈관심분야〉

발생공학, 유전자 변형 동물