

CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 돼지 수정란에서의 cd163 발현 효율 분석

박미령*, 이민국, 이보람, 옥선아, 변승준
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오횡학과

Analysis of CRISPR/Cas9 system mediated targeting of the cd163 gene in porcine embryos

Mi-Ryung Park*, Min Gook Lee, Bo Ram Lee, Sun A Ock, Sung June Byun
Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

요약 유전자 편집 돼지는 농업과 의료 분야에서 제공될 수 있어 폭넓게 각광 받고 있다. 최근 CRISPR/Cas9 시스템이 적용됨에 따라 genome editing이 효율적으로 향상되었다. 돼지 수정란 내 CRISPR/Cas9을 세포질내 미세주입으로 site specific mutations을 가능할 수 있게 하였다. 본 연구에서는 돼지 수정란 내 cd163 gRNA와 CRISPR/Cas9 components를 이용하여 도입한 후 그 효율성을 비교 분석하였다. CRISPR/Cas9 protein과 cd163 gRNA를 수정란 내 주입하여 발달율을 비교 분석한 결과 대조구 (90.6%)와 미세주입 그룹 (78.9% and 85.2%)에서 유의적 차이는 인정되지 않았다. 또한, 배반포 발달율을 비교 분석한 결과 CRISPR/Cas9 protein과 cd163 gRNA 주입 그룹 (19.9% and 19.6%)로 대조구와 (21.5%) 유사하게 나타났다. 각각의 배반포를 이용하여 cd163 유전자의 targeted modification을 분석하였다. 그 결과 cd163(10+134) gRNA를 주입한 그룹의 경우(22.7%) cd163(10) 주입한 그룹보다(12.9%) 유의적으로 높은 효율을 나타내었다. 유전자 변형은 4bp deletion 일어난 것부터 72bp insertions 패턴까지 다양한 패턴으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 CRISPR/Cas9 system을 돼지 수정란 내 미세주입 함으로써 유전자 편집 돼지 생산에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract Gene editing (GE) in pig production can have a wide impact by increasing the availability of gene-edited pigs for agriculture and biomedicine. Recent applications of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR-associated protein 9 (Cas9) system hold promise for improving the efficacy of gene editing. The cytoplasmic microinjection of the CRISPR/Cas9 system enables the induction of site-specific mutations in porcine zygotes. In this study, we examined the efficiency of the CRISPR/Cas9 protein and cluster of differentiation 163 (cd163) guide RNA (gRNA) components for introduction into zygotes by cytoplasmic microinjection. The cleavage rates of the CRISPR/Cas9 protein and cd163 gRNA injected groups (78.9% and 85.2%) were statistically similar to that of the control group (90.6%). Moreover, the blastocyst formation rates of the CRISPR/Cas9 protein and cd163 gRNA injected groups (19.9% and 19.6%) were also statistically similar to that of the control group (21.5%). When individual blastocysts were genotyped, we observed targeted modification of the genes in the subsequent blastocysts. In the samples of 10 ng/ul, each of the CRISPR/Cas9 protein and the cd163 (10+134) gRNA injected group (22.7%) was significantly higher ($p < 0.05$) than that in the 10 ng/ul samples each of CRISPR/Cas9 protein and cd163(10) gRNA injected group (12.9%). Various types of indel mutations, including 4 bp deletion to 72 bp insertions, were detected in the mutant blastocysts. These results suggest that the CRISPR/Cas9 technology can be applied to produce gene-edited pigs by direct zygote injection.

Keywords : CRISPR/Cas9, Porcine, Embryo, Cd163, Microinjection

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ016713022022)의 지원에 의해 이루어진 것임.

*Corresponding Author : Mi-Ryung Park(National Institute of Animal Science)

email: mrpark45@korea.kr

Received March 10, 2023

Revised April 6, 2023

Accepted April 7, 2023

Published April 30, 2023

1. 서론

돼지는 해부학적, 생리학적으로 사람과 가장 유사하여 질병 연구에 활용될 뿐만 아니라 유전자 조작을 통한 이종장기 이식 및 신약 물질 생산을 위한 형질전환 동물 제작으로 주목 받고 있다[1-4]. 형질전환 동물 생산 기술은 생명공학 분야에서 아주 빠르게 성장하고 있다. 처음으로 유전자 조작을 통한 형질전환 돼지는 수정란 전핵 내 유전자를 주입하여 생산하는 미세주입법을 통하여 생산된 바 있다[5]. 하지만, 이 방법의 경우 형질전환 돼지 생산 효율이 현저히 낮을 뿐만 아니라 유전자도 안정적으로 발현되지 않는 문제점들이 나타났다[6]. 핵치환 기술의 도입으로 체세포 내 유전자 조작을 통하여 유전자 발현 효율이 향상되었으며, 현재까지 형질전환 돼지 생산에 널리 이용되고 있다[7,8]. 그러나, 핵치환의 경우 기술의 숙련도에 따라 생산 효율성이 좌우되며, 동물 생산시 초기 유산, 기형 및 낮은 생존성 등 여러 문제점들이 보고되고 있다[9-11]. 따라서, 이러한 어려움을 보완함과 동시에 분자유전학적 기술이 고도화됨에 따라 Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)과 CRISPR-associated nucleases 9 (Cas9)과 같은 site-specific nucleases를 이용한 gene editing(GE) 연구가 급속히 진행되었으며, 이 기술을 이용한 동물 세포내 목적으로 하는 특이적인 사이트 내 mutation을 실시한 결과 효율이 높은 것으로 확인되었으며, 보다 쉽게 이용할 수 있어 여러 동물 종에 적용되고 있다[12-16]. 또한, CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 수정란 및 배아 세포질 내 주입으로 site-specific mutation을 유도할 수 있었다[17].

따라서, 본 연구에서는 양돈 농가에 경제적 손실을 초래하는 돼지 질병 중 하나인 돼지 생식기 호흡기 증후군(Porcine reproductive and respirator syndrome, PRRS)를 유도하는 유전자인 cd163의 기능을 억제하고자 CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 cd163 gRNA를 제작 한 후 발달을 및 mutation 효율을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 난자 채취 및 체외성숙 배양

돼지 난소는 김제 도축장으로부터 채취된 난소를 30~35°C로 유지된 0.9% 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하였다. 직경 3~6 mm 난포로부터 18g 주사

바늘이 부착된 일회용 주사기를 이용해서 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취 난자는 실제 현미경 하에서 난구세포 및 세포질이 균질한 것을 선별하여 0.1% PVA(polyvinyl alcohol)가 첨가된 TL-Hepes 용액에 최소 3회 세척 후 성숙 배양에 공시하였다. 체외성숙용 배양은 0.1% PVA(w/v), 3.05m M D-glucose, 0.91m M sodium pyruvate, 0.57mM cysteine, 75 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G 및 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin이 첨가된 TCM-199(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 기본으로 4-well dish(Nunc, Denmark)를 이용하여 well당 50-70개의 난자를 배양하며, 처음 20-22 시간 동안은 호르몬(0.5 $\mu\text{g/ml}$ LH, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ FSH)을 첨가하여 배양하였고, 나머지 20-22 시간 동안은 호르몬을 첨가하지 않고 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 체외성숙을 실시하였다.

2.2 체외수정 및 체외배양

체외성숙이 완료된 난자를 0.1% PVA 및 0.1% hyaluronidase가 포함된 PBS에 위치시켜 4분 동안 교반(vortex) 처리하여 난구세포를 제거한다. 난구세포가 제거된 난자들 중에서 제1극체가 명확히 확인되는 난자들만 공시재료로 사용한다. 체외수정을 위한 기본 배양액으로는 113.1 mM sodium chloride, 11.0 mM D-glucose, 2 mM caffeine sodium benzoate, 20mM tris, 5.0 mM calcium chloride dehydrate, 7.5 mM D-sorbitol, 4 mg/ml bovine serum albumin(BSA)가 첨가된 modified tris buffer medium(mTBM)을 사용하였으며, 6-well plate(Kitazato, Japan) 수정용 배양접시 내에 90 μl 첨가하여 각각 10개의 성숙 난자를 넣었다. 체외수정을 위한 정자는 mTBM 으로 $2\sim 3 \times 10^5$ 개/ml의 농도로 희석한 후 체외수정을 실시하였다. 체외수정은 5 시간 후 4 mg/ml BSA가 첨가된 PZM-3 체외배양액(In Vitro Culture; IVC)으로 3회 이상 세척하여 유전자 주입 후 체외배양에 이용하였다.

2.3 세포질내 외래 유전자 주입

미세조작용 배양액은 TCM 199 medium (Gibco BRL) 배양액에 0.59 mM sodium bicarbonate, 3.14 mM HEPES, 30.2 mM sodium chloride, 50 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G, 60 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin이 포함되어 제조하여 사용하였다. CRISPR/Cas9은 Tris-EDTA buffer (TE buffer)에 농도별로 희석하여 준비한 다음 CRISPR/Cas9 용액의 난자 세포질 내 주입을 위해 성숙

이 완료된 난자를 초고속 원심분리기로 난자 내 지질 성분을 원심분리 후 세포질 내 유전자 주입이 용이하도록 준비하였다. cd163 미세주입용 벡터는 CRISPR/Cas9 단백질과 함께 난자의 세포질내 직접 주입을 실시하였다. 벡터의 농도는 10 ng/ μ l 농도로 조정하였다. cd163 guide RNAs는 Whitworth 등 (2014)[17] 그룹에서 보고한 타겟 사이트를 본 실험에 이용하였다.

2.4 배반포에서의 외래유전자 도입 여부 분석

CRISPR/Cas9 벡터가 도입된 수정란의 형질전환 여부를 확인하기 위해 배반포에서 genomic DNA를 분리한 후 Table 1과 같은 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 증폭 산물은 목적 부위에 유전자의 mutation 여부를 확인하기 위하여 Sequencing을 실시하여 mutation 여부에 따라 WT(Wild Type)과 Mutation(%)으로 표기하였으며, 염기서열 분석은 Genetyx 프로그램을 사용하였다.

Table 1. The primer sequence for PCR amplification

Primers	Sequences	Tm(°C)
cd163(10)	F: GGAGGTCTAGAATCGGCTAAGCC	68
	R: GGCTACATGTCCCCTCAGGG	
cd163(134)	F: GATCTGGCATTGCTGCAGCTCAG	61
	R: CTCAGACCCAGTGCTGCCATG	

2.5 통계처리

통계처리는 SAS Enterprise Guide 7.1 프로그램을 이용하였으며, t-test로 처리구간 유의성 검정을 실시하였고, p 값은 0.05 이하인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다(P<0.05, Mean±SE).

3. 결과 및 고찰

3.1 cd163 gRNA 제작

Guide RNA는 cd163의 7번 엑손 영역에서 디자인 되어졌으며 GGAAACCCAGGCTGGTTGGAgGG (CRISPR 10)과 GGAACCTACAGTGCGGCACTGtGG (CRISPR 134) 두 부분을 목적 사이트로 선택하여 제작에 이용하였다. 각 PAM (*Streptococcus pyogenes*(Spy) protospacer adjacent motif) 사이트는 gGG 와 tGG 로 표기하였다[18].

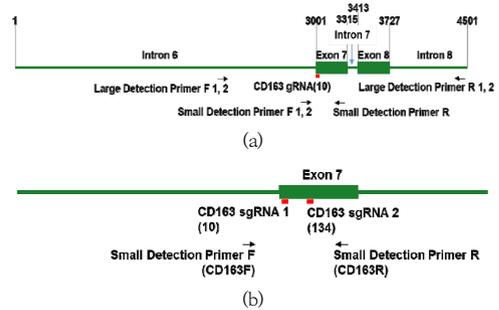


Fig. 1. Constructure of cd163 (10) vector (a) and cd163 (10+134) vector (b).

Table 2. Developmental competence of CRISPR/Cas9 mediated porcine cd163 gene

Gene	IVC	(%) 2cell	(%) Blastocyst
Control	93	84(90.6±2.7)	20(21.5±0.3)
cd163(10)	643	508(78.9±2.4)	131(19.9±1.2)
cd163(10+134)	381	325(85.2±0.7)	75(19.6±0.6)

3.2 체외수정란 내 유전자 주입 후 발달을 분석

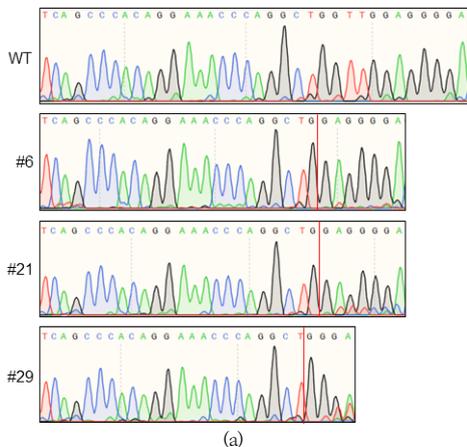
Table 2에서 보는 바와 같이, 세 그룹 간 발달달에 미치는 영향을 조사한 결과 대조구와 처리구 간의 분할율의 경우 90.6%, 78.9% 그리고 85.2%로 나타났다. 배반포 발달의 경우 21.5%, 19.9% 그리고 19.6%로 처리군에서 다소 낮은 발달율을 보였으나, 유의적 차이는 인정되지 않았다. 따라서, 유전자 도입으로 인한 체외수정란의 발달은 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. Tanihara 그룹에(2019)[19] 따르면, 체외수정 전과 후에 세포질 내 유전자를 주입하는 경우 배반포 발달율에는 유의적 차이가 없었으며, 체외수정 전과 후로 주입 횟수를 2회로 하였을 경우 난할율과 배반포 발달율에서 유의적으로 낮은 결과를 보고하였다. 본 연구 결과에서는 체외수정 후 6시간째 세포질 내 유전자를 1회 주입하는 방법을 이용하였으며, 그 결과 세 그룹에서 유의적 차이를 나타내지 않았다. 따라서, 돼지 체외수정란의 발달에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 3. Targeting efficiency of CRISPR/Cas9 mediated porcine cd163 gene

Gene	IVC	Sequencing	
		WT	Mutation (%)
cd163(10)	131	114	17(12.9±1.2)
cd163(10+134)	75	55	17(22.7±0.6)*

3.3 체외수정란 내 유전자 주입 후 효율성 분석

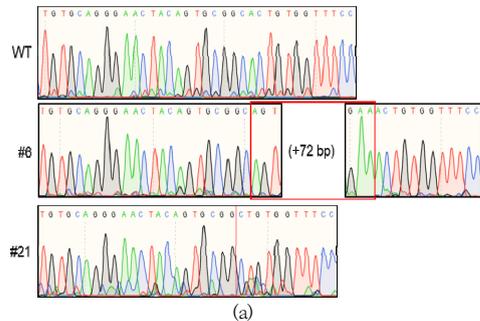
Table 3에서 보는 바와 같이, 두 그룹의 배반포를 이용하여 target site 내 mutation 효율을 분석하였다. 그 결과 cd163 (10)의 경우 배반포 131 개중 17에서 mutation이 일어난 것을 확인할 수 있었으며 12.9%의 효율을 나타내었다. cd163 (10+134) 주입한 그룹에서는 75개의 배반포를 이용하여 sequencing을 실시하였고, 그 중 17개 배반포에서 mutation이 일어나 22.7%로 cd163(10) 처리 그룹보다 유의적으로 높은 효율성을 나타내었다. 따라서, cd163 유전자의 경우 두 영역 모두를 주입하는 것이 유의적으로 높은 mutation 효율을 보이는 것으로 나타났다. Mutation 형태를 확인해 본 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 cd163(10) 주입 그룹에서는 4bp~8bp의 deletion이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한, Fig. 3의 cd163(10+134) 그룹에서는 2bp deletion이 일어났을 뿐만 아니라 72bp insertion이 일어나는 부분도 확인하였다.



WT	ICAGCCACAGGAAACCCAGGCTGGTTGGAGGGGA
#6	ICAGCCACAGGAAACCCAGGCTG----GAGGGGA
#21	ICAGCCACAGGAAACCCAGGCTG----GAGGGGA
#29	ICAGCCACAGGAAACCCAGGCT-----GGGA

(b)

Fig. 2. Effect of CRISPR/Cas9 system in targeting cd163(10) in porcine embryos. (a) Sequencing read of a homozygous deletion caused by the CRISPR/Cas9 system. (b) The image represents no. #6, #21 and #29 carrying 4bp-8bp deletion of cd163(10). All the embryos examined by DNA sequencing showed mutation on the cd163(10).



(a)

WT	TGTGCAGGGAACCTACAGTGCGGCACTGTGGTTCC
#6	TGTGCAGGGAACCTACAGTGCGGCAGI(+72bp)GAAACTGTGGTTCC
#21	TGTGCAGGGAACCTACAGTGCGG---CTGTGGTTCC

(b)

Fig. 3. Effect of CRISPR/Cas9 system in targeting cd163(10+134) in porcine embryos. (a) Sequencing read of a homozygous deletion caused by the CRISPR/Cas9 system. (b) The image represents no. #6 and #21 carrying from 2bp deletion to 72bp insertion. All the embryos examined by DNA sequencing showed mutation on the cd163(10+134).

Whitworth 등(2014)[17] 그룹에 따르면, cd163 site의 경우 1 bp에서 부터 11 bp까지 insertion이 일어남을 확인하였고, deletion의 경우 최소 11 bp부터 1506 bp까지 일어남을 보고하고 있다. 이는 유전자 주입 시 2종류의 CRISPR를 이용할 경우 한 종류를 이용한 경우 보다 deletion 되는 사이즈가 더 크게 일어남을 확인하였으며, 실험자의 숙달 정도나 실험실 셋팅에 따라 유전자 편집 효율에 차이가 발생 할 수 있다고 보고하고 있다. 또한, mutation 효율의 차이는 guide와 target으로 하는 유전자의 combination에 따라 조절될 수 있다고 보고된 바 있다[19].

4. 결론

본 연구 결과를 바탕으로 돼지 수정란 내 CRISPR/Cas9를 이용하여 cd163 mutants를 주입한 후 형질전환 효율을 분석 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) cd163 mutants 주입 그룹의 경우 분할율과 배반포 발달율에서는 대조구와 유의적 차이가 인정되지 않음을 확인하였다.
- (2) cd163 mutants 단일 영역(10) 보다 두 영역을 (10+134) 모두 주입한 그룹에서 Gene editing

효율이 유의적으로 높게 나타난 것을 확인하였다.

- (3) cd163 mutants 주입 결과 2~8bp deletion이 일어날 뿐 만 아니라 72bp insertion도 확인되었다.

본 연구에서는 양돈 산업에 있어 경제적 영향을 미치는 돼지 질병 중 하나인 생식기 호흡기 증후군을 유발하는 유전자 변형을 실시하여 그로 인하여 발생할 수 있는 유사산 등의 생식기 장애와 심각한 호흡부전을 일으키는 호흡기 문제 등을 해결하기 위하여 형질전환 돼지 생산을 위한 기초 실험을 실시하였다. 이러한 연구를 토대로 향후 돼지 전염병 바이러스 예방 관련 연구에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] M. H. Ji, J. J. Yang, J. R. Q. Wu, 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.257-263, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.650796>
- [2] M. Aloï, L. Nardo, G. D. Dilillo, A. Giudice, E. D. Marocchi, E. F. Viola, F. Civitelli, A. Berni, S. Cucchiara, "Premature subclinical atherosclerosis in pediatric inflammatory bowel disease." *Journal of Pediatrics*, Vol.161, No.4, pp.589-594, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.03.043>
- [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] R. E. Hammer, V. G. Purse, C. E. Rexroad Jr, R. J. Wall, D. J. Bolt, K. M. Ebert, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, "Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection", *Nature*, Vol.315, pp.680-683, 1985.
DOI: <https://doi.org/10.1038/315680a0>
- [6] A. W. S. Chan, G. Kukulj, A. M. Skalka, R. D. Bremel, "Timing of DNA intergration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection", *Molecular Reproduction & Development*, Vol.52, No.4, pp.406-413, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4%3C406::AID-MRD9%3E3.0.CO:2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4%3C406::AID-MRD9%3E3.0.CO:2-P)
- [7] L. Lai, D. Kolber-Simonds, K. W. Park, H. T. Cheong, J. L. Greenstein, et al., "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning", *Science*, Vol.295, No.5557, pp.1089-1092, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1068228>
- [8] Y. Dai, T. D. Vaught, J. Boone, S. H. Chen, C. J. Phelps, et al., "Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs", *Nature biotechnology*, Vol.20, No.3, pp.251-255, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0302-251>
- [9] D. B. Carter, L. Lai, K. W. Park, M. Samuel, J. C. Lattimer, K. R. Jordan, D. M. Estes, C. Besch-Williford, R. S. Prather, "Phenotyping of transgenic cloned piglets", *Cloning Stem Cells*, Vol.4, No.2, pp.131-145, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1089/153623002320253319>
- [10] N. Shimozawa, Y. Ono, S. Kimoto, K. Hioki, Y. Araki, Y. Shinkai, T. Kono, M. Ito, "Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny", *Genesis*, Vol.34, No.3, pp.203-207, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1002/gene.10143>
- [11] M. R. Park, S. K. Cho, S. Y. Lee, Y. J. Choi, J. Y. Park, et al., "A rare and often unrecognized cerebromeningitis and hemodynamic disorder: a major cause of sudden death in somatic cell cloned piglets", *Proteomics*, Vol.5, No.7, pp.1928-1939, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200401079>
- [12] W. Y. Hwang, Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J.-R. J. Yeh, J. K. Joung, "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system", *Nature Biotechnology*, Vol.31, No.3, pp.227-229, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- [13] Y. Niu, B. Shen, Y. Cui, Y. Chen, J. Wang, L. Wang, Y. Kang, X. Zhao, et al., "Generation of gene-modified Cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos", *Cell*, Vol.156, No.4, pp.836-843, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
- [14] H. Wang, H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch, "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering", *Cell*, Vol.153, No.4, pp.910-918, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- [15] D. Li, Z. Qiu, Y. Shao, Y. Chen, Y. Guan, Y. Li, N. Gao, L. Wang, X. Lu, Y. Zhao, M. Liu, "Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system", *Nature Biotechnology*, Vol.31, No.8, pp.681-683, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2661>
- [16] T. Hai, F. Teng, R. Guo, W. Li, Q. Zhou, "One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system," *Cell Research*, Vol.24, No.3, pp.372-375, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2014.11>

[17] K. M. Whitworth, K. Lee, J. A. Benne, B. P. Beaton, L. D. Spate, et al., "Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos", *Biology of Reproduction*, Vol.91, No.3, pp.1-13, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121723>

[18] L. Cong, F. A. Ran, D. Cos, S. Lin, R. Barrento, N. Habib, P. D. Hsu, et al., "Multiplex genome engineering using Crispr/Cas systems", *Science*, Vol.339, No.6121, pp.819-823, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

[19] F. Tanihara, M. Hirata, N. T. Nguyen, Q. A. Le, T. Hirano, T. Takemoto, M. Nakai, D. I. Fuchimoto, T. Otoi, "Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation", *Animal Science Journal*, Vol.90, No.1, pp.55-61, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1111/asi.13129>

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 민 국(Min Gook Lee)

[정회원]



- 2017년 8월 : 전북대학교 동물생명공학과 (학사)
- 2023년 2월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2019년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

줄기세포

이 보 램(Bo Ram Lee)

[정회원]



- 2011년 2월 : 서울대학교 농생명공학부 (농학박사)
- 2016년 3월 ~ 2019년 1월 : 서울대학교 농업생명과학연구원 선임연구원
- 2019년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물생명, 줄기세포

옥 선 아(Sun A Ock)

[정회원]



- 2001년 2월 : 경상대학교 생물학과 (동물학석사)
- 2004년 2월 : 경상대학교 생물학과 (동물학박사)
- 2011년 12월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

발생학, 줄기세포학, 재생의학

변 승 준(Sung June Byun)

[정회원]



- 1997년 8월 : 경북대학교 유전공학과 (이학석사)
- 2003년 2월 : 가톨릭대학교 의학과 (의학박사)
- 2006년 8월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사/관

<관심분야>

동물생명공학