

체세포 복제 한우 수소의 정액 성상, 정자의 활동성 및 수정 능력 분석

배성훈^{1,2} · 황성수¹ · 양병철¹ · 고응규¹ · 김동훈¹ · 임기순¹ · 최화식² · 진동일³ · 양보석¹ · 성환후^{1,†}

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, ²신홍대학교 임상병리학과, ³충남대학교 동물자원학부

Analysis of Semen Parameters, Sperm Activity, and Fertility of Somatic Cell Cloned Hanwoo Bulls

Seong-Hoon Bae^{1,3}, Seongsoo Hwang¹, Byong-Chul Yang¹, Yeoung-Kyu Go¹, Dong-Hoon Kim¹, Gi-Sun Im¹, Hwa-Sik Choi², Dong-Il Jin³, Boh-Suk Yang¹ and Hwan-Hoo Seong^{1,†}

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Shin Heong College, Uijeongbu 480-701, Korea

³Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the reproductive characteristics of the cloned Hanwoo bulls produced by SCNT. The semen ejaculated from the cloned bulls (C-38 and C-39) and normal Hanwoo bull was properly measured the volume, the number of sperm, and the viability of frozen-thawed sperm. The sperm activity was analyzed using computer assisted sperm analysis (CASA). To analyze fertilizing ability of the cloned bulls, *in vitro* fertilization and artificial insemination were performed using the frozen-thawed semen. There were no differences in semen volume, sperm concentration, and the viability of frozen-thawed sperm between cloned bulls and normal bull. The difference was statistically significant in total motility, curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), and average-path velocity (VAP) of both cloned bulls compared to those of normal Hanwoo bull, respectively ($p < 0.05$). The cleavage and blastocyst development rate were not different between the groups. Five cloned cows were artificially inseminated using the frozen-thawed semen of C-38, two of them became pregnant. Two second generation calves (one male and one female) were produced. Based on these results, the cloned Hanwoo bulls showed normal reproductive abilities of semen parameters and sperm activity to their comparators and produced cloned calves, although there are some individual differences on the parameters.

(Key words : Cloned Hanwoo Bull, Sperm motility, CASA, Fertility)

요 약

본 연구는 체세포를 이용하여 생산된 복제 한우 수소의 번식능력을 검토하기 위해 실시하였다. 복제 한우 수소(C-38 및 C-39) 또는 일반 한우 종모우로부터 정액을 채취하여 정자의 수 및 동결 전·후의 생존성 등을 살펴보았으며, 정자의 운동성 등은 computer assisted sperm analysis(CASA)를 이용하여 측정하였다. 또한, 이들의 수정 능력을 확인하기 위하여 체외수정과 인공수정을 각각 실시하였다. 정액 성상에서는 복제 수소들과 일반 종모우 간에 정액의 양, 정자의 농도 및 동결융해 후의 생존성 등에서 차이가 나타나지 않았다. CASA를 이용한 분석에서 운동성, 곡선 운동 속도(VCL), 직선 운동 속도(VSL) 및 평균 진행 속도(VAP) 등은 복제 수소의 정액이 일반 종모우의 정액에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 체외수정에 따른 수정란의 분화율 및 배반포로의 발달율은 복제 수소와 일반 종모우 간에 차이가 나타나지 않았다. 복제소 정액(C-38)을 이용하여 인공수정을 한 5두의 체세포 복제 대리모에서 암·수 각각 한 두씩의 건강한 복제 후대 송아지 2두를 생산하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 실험에 공시된 복제 수소 개체 간의 차이가 나타나지는 하였지만, 복제 수소는 정액 성상과 정자의 운동성 등에서 일반 종모우와 차이가 없었으며, 또한 인공수정을 통해 송아지를 생산함으로써 정상적인 번식능력이 있음을 확인하였다.

서 론

최초의 체세포 복제 양 Dolly가 성공적으로 태어난 이

[†] Corresponding author : Phone: +82-31-290-1621, E-mail: seonghh@rda.go.kr

후(Campbell 등, 1996), 많은 연구자들이 복제란 및 복제동물의 생산 및 발달에 대하여 다양한 연구를 수행하여 오고 있다(Kato 등, 1998; Wakayama 등, 1998; Kubota 등, 2000; Polejaeva 등, 2000; Wells, 2003). 하지만 복제동물의 생산은 10% 미만의 낮은 효율과 높은 유산율 및 출생 후 조기 사망의 주 원인으로 생각하는 거대산자증 후군과 같은 문제점들을 가지고 있는 것이 사실이다(Young과 Fairburn, 2000).

체세포를 이용한 복제동물 생산에 관한 연구는 주로 복제란 또는 복제 태아의 발달, 출생 후 조기 사망 등 복제동물의 비정상성과 관련된 분야에 관해 진행되고 있는 실정이다. 정상적으로 성장한 복제동물의 번식능력에 관한 연구는 일부에서 진행되고 있지만 미흡한 실정이다(Heyman 등, 2004; Shiga 등, 2005). 특히 복제 수소의 번식생리에 관한 연구는 거의 보고되지 않고 있다.

정자의 질을 측정하는 대표적인 방법은 숙련된 전문인력에 의한 주관적인 측정 방법이 주로 사용되어 왔다. 하지만 이러한 측정 방법은 작업자의 숙련도에 따라 다소 차이가 나타나는 단점이 있어 최근에는 정자의 생존성이나 기타 요소들을 분석하기 위하여 형광물질을 이용한 flow cytometric evaluation 기법이 도입되기도 하였다(Gillan 등, 2005; Park 등, 2006). 동물에서도 보다 객관적으로 정자의 상태를 측정할 수 있는 방법으로 computer assisted sperm analysis(CASA)가 이용되고 있다(Verstegen 등, 2002). 최근에는 CASA를 이용하여 야생 반추동물의 정소상체 정액(Martinez-Pastor 등, 2005a, b)과 사출된 정액(Farell 등, 1998)을 분석하였다고 보고되기도 하였다.

본 연구에서는 체세포 복제 한우 수소의 번식생리학적 능력을 검토하기 위하여 신선 또는 동결 정액의 정액 성상, CASA 방법을 이용한 정자 활동성 관련 요소 및 수정 능력 등을 분석하였다.

재료 및 방법

정액 채취 및 성상 분석

태아 섬유아세포를 이용해 생산된 복제 수소 C-38(34개월령)과 C-39(30개월령) 및 일반 종모우(36개월령)의 정액 채취는 인공질을 이용한 방법을 사용하여 채취하였으며, 정액 성상을 분석한 다음 복제 수소의 정액은 동결하여 액체 질소에 보관하였다. 동결 정액에 대한 대조구는 농협중앙회 한우개량사업소에서 상업적으로 시판하고 있는 일반 한우 종모우(KPN-178)의 동결 정액을 사용하였다.

정자 처리 및 활동성 분석

동결 정액을 액체 질소에서 꺼내어 상온에서 10초간 정치시킨 후, 38°C에서 10분간 침지하여 용해하였다. 각각의 정액은 90%와 45% Percoll 층을 이용하여 1,500 rpm으로 20분간 원심분리하였고, 분리된 정자는 0.6% BSA가 첨가된 정자 처리액(sperm-TALP)을 이용하여 1,500 rpm으로 5분 동안 2회 원심분리를 실시하여 처리하였다. 각각의 정자의 활동성은 CASA Program(SAIS ALPHA

version 1.2, Medicalsupply, Co, Korea)을 사용하여 분석하였다. 비교 항목은 운동성(total motility), 곡선 운동 속도(curvilinear velocity, VCL), 직선 운동 속도(straight-line velocity, VSL), 평균 진행 속도(average-path velocity, VAP), Linearity(LINE) 및 Straightness (STR) 등 6가지를 3회 반복 측정하였다.

체외수정 및 체외 배양

도축장에서 도축된 소의 난소에서 10 ml 주사기에 18 G 주사침을 이용하여 직경 2~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실체현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외수정 및 체외배양에 사용된 시약은 별도의 표기가 없는 한 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 10% FBS(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 함유된 TCM-199(Gibco-BRL)에 10 µg/ml FSH-P(Follitropin-V), 1 µg/ml estradiol-17 그리고 10 ng/ml EGF를 첨가하여 사용하였다. 미성숙난자는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용해 mineral oil이 피복된 500 µl 체외 성숙용 배양액에 30~50개의 난자를 침적하여, 39°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 20시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 체외수정은 0.6% BSA, 2 µg/ml Heparin, 4% PHE (0.372 mg/ml penicillamine, 0.11 mg/ml hypotaurine, 0.018 mg/ml epinephrine)가 함유된 수정용 배양액 (Fertilization-TALP)을 사용하였다. Mineral oil이 도포된 100 µl 수정용 소적에 난구세포를 제거하지 않은 성숙된 난자 20개씩을 침적, 각 소적당 1×10⁶개씩의 정자를 첨가 후 5% CO₂, 39°C 배양액에 24시간 배양하였다. 수정란은 난구세포를 완전히 제거한 후 0.3% BSA가 함유된 CR2aa 배양액 50 µl 소적 당 10개씩 넣어 3일간 배양하였고, 그 후 5% FBS가 함유된 50 µl 소적에 옮긴 후 다시 5일간 배양하고 배반포 및 수정란의 각 단계를 확인 관찰하였다.

인공 수정을 이용한 번식능력 확인

인공수정은 복제 수소(C-38)의 동결 정액을 사용하였으며, 동기화 처리된 대리모에 배란 전 13~18시간 사이에 0.5 ml 정액 스트로 1개를 직장질법을 이용하여 자궁경에 주입하였다. 대리모는 체세포 복제 한우 암소 5두를 사용하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 자료는 Statistical Analysis System (SAS, USA)를 이용하여 각 처리간 χ^2 방법을 이용하여 유의적 차이를 검정하였다. 유의성 검정은 0.05 미만($p < 0.05$)일 때 통계적으로 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

정액 성상 분석에 대한 결과는 Table 1과 같다. 정액의 양은 두 복제 수소와 일반 종모우 간에 차이가 나타나지 않았다. 또한, 정자의 수 및 동결 전·후 생존성에서 다소 차이가 나타나기는 하였으나, 통계적 유의성은 나타나지

Table 1. Semen parameters and sperm viability of cloned Hanwoo bulls

Bull [*]	Ejaculate volume (ml)	Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	Viability (%)	
			Fresh	Frozen
C-38	6.5	2,755	89.8	61.0
C-39	4.5	1,414	89.5	35.7
Control	6.2	1,003	92.0	65.5

* C-38 & 39, SCNT cloned Hanwoo bull; Control, normal Hanwoo bull.

않았다.

CASA 방법을 이용한 정자의 활동성 분석은 Table 2와 같다. 각각의 비교 실험에서 total motility, VCL, VSL 및 VAP 항목에서는 두 복제 수소의 신선 또는 동결 정액이 일반 종모우 동결 정액의 각 항목보다 유의적 높았다 ($p < 0.05$). 하지만 LINE과 STR 항목에서는 일반 종모우와 복제 수소(C-38 및 C-39)의 동결 정액 간에 통계적 유의성이 인정되지 않았다.

복제 수소의 수정 능력을 확인하기 위한 체외수정 결과는 Table 3과 같다. 난황을 및 배반포로의 발달을 모두에서 두 복제 수소와 일반 종모우 간에 차이가 나타나지 않았다. 특히 배반포로의 발달에 있어서 C-38이 다소 높은 경향을 보였으나 통계적 차이는 인정되지 않았다.

또한, 복제 수소(C-38)의 동결 정액을 이용하여 실시한 인공수정 연구에서 인공수정을 실시한 체세포 복제 한우 암소 5두 중 2두에서 임신이 확인이 되었으며, 이들에게서 건강한 암·수 송아지가 각각 태어났다(Table 4).

고찰

복제 수소의 번식생리에 관련된 기초자료를 확보하기 위해 실시한 본 연구에서 정액이나 정자의 성상에서 일반 한우 종모우와 비교하여 차이가 나타나지 않음을 알

Table 3. *In vitro* development of embryos fertilized with frozen-thawed cloned bull semen

Bull [*]	No. of oocytes	No. of embryos (mean \pm SD)	
		Cleavage	Blastocyst
C-38	116	85(70.3 \pm 15.4)	35(28.6 \pm 9.0)
C-39	114	78(68.2 \pm 6.3)	26(22.4 \pm 9.2)
Control	228	157(73.1 \pm 5.9)	41(21.7 \pm 5.2)

* C-38 & 39, SCNT cloned Hanwoo bull; Control, normal Hanwoo bull.

Table 4. Second generation new born calves by AI using frozen-thawed cloned bull semen

Calf	Heifer (age ¹)	Sex	Birth weight (kg)
1	SCNT(27 mon)	♀	24.5
2	SCNT(27 mon)	♂	30.2

¹ at artificial insemination.

수 있었다. 또한 복제 수소의 동결 정액을 이용한 번식 능력 연구에서도 체외 배 발달이나 인공수정을 통한 후

Table 2. Comparisons of the sperm activities between cloned and normal Hanwoo bulls

Activity	Fresh C-38	Frozen-thawed		
		C-38	C-39	Control
TM (%)	90.4 \pm 4.3 ^a	87.6 \pm 3.0 ^a	94.0 \pm 1.9 ^a	75.1 \pm 5.7 ^b
VCL (%)	199.8 \pm 15.9 ^{ab}	195.1 \pm 15.3 ^{ab}	229.9 \pm 25.5 ^a	163.2 \pm 17.9 ^b
VSL (%)	68.5 \pm 5.6 ^b	64.4 \pm 2.9 ^{bc}	86.7 \pm 3.5 ^a	58.4 \pm 4.8 ^c
VAP (%)	94.2 \pm 7.5 ^b	88.7 \pm 8.9 ^{bc}	110.2 \pm 7.9 ^a	76.8 \pm 7.3 ^c
LINE (%)	34.3 \pm 1.0 ^b	33.1 \pm 1.1 ^b	37.9 \pm 2.6 ^a	35.9 \pm 1.5 ^{ab}
STR (%)	72.8 \pm 1.1 ^b	77.7 \pm 0.4 ^a	78.7 \pm 2.3 ^a	76.1 \pm 2.4 ^{ab}

^a TM, Total motility; VCL, Curvilinear velocity; VSL, Straight-line velocity; VAP, Average-path velocity; LINE, Linearity; STR, Straightness.

^{a-c} Values with different superscripts in the same column differ ($p < 0.05$).

Data were expressed as mean \pm SD.

대 생산에서 정상적인 수정 능력이 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에 공시된 체세포 복제 수소 2두는 생후 30개월 이상된 한우로서 생리학적으로 정상이었다. 복제 수소의 정액 성상에 대한 분석에서 사출된 정액의 양은 4.5~6.5 ml로서 정상 범주에 포함된다고 할 수 있다. 사출 정액의 양은 축종에 따라 다소 차이가 나는 것으로 알려져 있지만 일반 수소의 경우 5~8 ml의 정액을 사출하는 것으로 보고되고 있다(Hafez, 1993).

분할구 분할에 의해 생산된 유전적으로 동일한 4두의 수소를 이용한 정액 성상 연구에서 7.6~10.2 ml의 정액 양을 보였고(Lessard 등, 2003), 복제 홀스타인 수소의 경우 3.5~7.1 ml로 보고하여(Heyman 등, 2004; Tecirlioglu 등, 2006) 사출 정액의 양은 정상 수소와 별다른 차이가 나지 않는 것으로 판단된다. 하지만 Shiga 등(2005)은 일본 복제 화우(Japanese Black sire)를 이용한 연구에서 1.9~3.6 ml의 정액을 사출한 것으로 보고하여 축종 간에 다소 차이가 남을 확인할 수 있었다.

복제 수소로부터 사출된 정액 속의 정자 수는 $6 \sim 10 \times 10^8$ /ml개 정도로 보고되었다(Lessard 등, 2003; Heyman 등, 2004; Tecirlioglu 등, 2006). 본 연구에서도 일반 종모우와 C-38의 경우 정상 범주에 포함이 되나, C-38의 경우 다소 많은 정자 수를 확인할 수 있었다. 박 등(2003)은 현재 한우 보증 종모우의 정액 생산 능력은 Brito 등(2002)이 보고한 정액량 6.2~7.8 ml, 정액 농도 $13 \sim 15 \times 10^8$ /ml 및 총 정자수 $82 \sim 113 \times 10^8$ /ml의 범위를 정상적인 것으로 보고하고 있다. 하지만 이러한 수치는 채취 시기 또는 사정 빈도 등에 따라 유의적인 차이를 보여준다고 하였다.

현재까지 동물에서 CASA 방법이 정자의 활동성을 측정하는 대표적인 방법으로는 사용되고 있지 않다. 최근 CASA 방법을 이용하여 수소 정액의 상태를 살펴보는 연구가 보고되고 있다(Hallap 등, 2006; Tecirlioglu 등, 2006). CASA의 여러 측정 요소 중에서 total motility, VCL, progressive motility, STR 및 VAP 등이 CASA를 이용한 정자의 활동성과 관련된 측정에서 중요한 요소로서 사용이 되고 있다. 특히 total motility, progressive motility 및 VAP 등의 요소는 동결 보존에 있어서 가장 중요한 요소라고 알려져 있다 (Watson 1995, 2000; Bailey 등, 2000).

Lessard 등(2003)은 분할구 분리에 의해 생산된 유전적으로 동일한 4두의 수소를 이용한 연구에서 동결 보존 후 1두에서 유의적으로 차이가 나타난다고 보고하였다. 하지만 다른 연구자들은 동결 보존 후에도 유의차가 나타나지 않는다고 보고하여 연구자에 따라 다소 차이를 나타내었다(Leibo와 Bradly, 1999).

복제 수소의 경우, 개체의 희소성과 CASA 방법 등을 이용한 연구가 거의 보고된 바가 없다. Tecirlioglu 등(2006)이 체세포 복제 개체를 이용한 연구에서 동결 용해한 정자의 VAP, VCL 및 VSL 등이 신선 정액에 비하여 낮게 나타나는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 C-38 개체의 경우, VSL과 VAP 요소는 동결용해 후에 유의적으로 낮아졌으나, STR의 경우 오히려 유의적으로 높아진 것으로 나타났다. 그리고 total motility, VCL 및 LINE 등의 항목은 신선 상태와 동결 용해 후의 상태가 차이가 나지 않았다. 하지만 여러 측정 항목들에서 일반 한우 종모우의 동결 정액과의 비교에서는 복제 한우 수소의 정자

활동성이 오히려 높은 것으로 나타났다. 아직까지 동물들에서 CASA를 이용한 정자의 활동성 분석에 활성화 되어 있지 않아 본 연구의 결과와 객관적으로 비교할 수 있는 자료가 부족한 것이 사실이다. 따라서 이에 대한 좀 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

정자의 수정 능력을 확인하기 위하여 체외수정과 인공수정을 실시한 결과, 체외수정에 의한 분할출과 배반포로의 발달율은 모든 개체에서 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 이러한 연구 결과는 다른 연구자들의 복제 수소의 정액을 이용한 체외수정 연구들과 유사한 결과라 할 수 있다(Heyman 등, 2004; Shiga 등, 2005).

한편, C-38의 동결 정액을 이용하여 복제 암컷 5두에 각각 인공수정을 실시한 결과, 2두의 복제 후대 송아지가 분만되었다. Heyman 등(2004)은 10두의 복제 암컷에 인공수정을 실시하여 1두의 송아지가 태어났다고 보고하였으며, Shiga 등(2005)은 복제 수소의 정액을 일반 암컷 22두에 인공수정한 결과 12두에서 임신이 확인되었으며, 10두의 복제 후대 송아지가 태어났다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 정상적으로 출생하여 성장한 복제동물의 경우 정상적인 번식능력이 있음을 나타낸다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 실험에 공시된 복제 수소 개체 간의 차이가 나타나기는 하였지만, 복제 수소는 정액 성상과 정자의 운동성 등에서 일반 종모우와 차이가 없음을 알 수 있었고, 또한 인공수정을 통해 송아지를 생산함으로써 정상적인 번식능력이 있음을 확인하였다.

인용문헌

- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N (2000): Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21:1-7.
- Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP (2002): Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58:1175-1186.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Farell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH (1998): Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871-879.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM (2005): Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63:445-457.
- Hafez ESE (1993): Preservation and cryopreservation

- of gametes and embryos. In: Hafez ESE, ed. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; pp. 503-525.
8. Hallap T, Jaakma U, Rodriguez-Martinez H (2006): Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reprod Domest Anim* 41:214-218.
 9. Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Galli C (2004): Zootechnical Performance of Cloned Cattle and Offspring: Preliminary Results. *Cloning Stem Cells* 6:111-120.
 10. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
 11. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl Acad Sci USA* 97:990-995.
 12. Leibo SP, Bradley L (1999): The male gamete from basic science to clinical applications. In: Gagnon C, editor. *Vienna, IL: Cache River Press* 501-516.
 13. Lessard C, Masseau I, Bilodeau JF, Kroetsch T, Twagiramungu H, Bailey JL, Leclerc P, Sullivan R (2003): Semen characteristics of genetically identical quadruplet bulls. *Theriogenology* 59:1865-1877.
 14. Martinez-Pastor F, Diaz-Corujo AR, Anel E, Herraes P, Anel L, de Paz P (2005a): Postmortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 64:958-974.
 15. Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, Herraes P, de Paz P, Anel L (2005b): Decay of sperm obtained from epididymides of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63:24-40.
 16. Park CG, Kim SW, Lee PY, Han JH, Lee HG, Byun SJ, Yang BS, Lee CH, Lee HT, Chang WK, Park JK (2006): Sperm Fertility of Transgenic Boar Harboring hEPO Gene is Decreased. *Reprod Dev Biol* 30: 27-34.
 17. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
 18. Shiga K, Umeki H, Shimura H, Fujita T, Watanabe S, Nagai T (2005): Growth and fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull. *Theriogenology* 64:334-343.
 19. Tecirlioglu RT, Cooney MA, Korfiatis NA, Hodgson R, Williamson M, Downie S, Galloway DB, French AJ (2006): Semen and reproductive profiles of genetically identical cloned bulls. *Theriogenology* 65: 1783-1799.
 20. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
 21. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
 22. Waston PF (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871-891.
 23. Waston PF (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 61: 481-492.
 24. Wells DN (2003): Cloning in livestock agriculture. *Reprod Suppl* 61:131-150.
 25. Young LE, Fairburn HR (2000): Improving the safety of embryo technologies: Possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 53:627-648.
 26. 박노형, 이성수, 정준, 원유석, 김내수 (2003): 한우 종모우의 고환들레와 정액생산 및 번식과의 관계. *동물자원과학회지* 45:517-522.

(접수일자: 2007. 7. 30 / 채택일자: 2007. 8. 18)