

형질전환 돼지의 정자와 일반돼지의 정자성상에 대한 비교평가

박상현, 이진섭, 이주영, 김경운, 변승준, 육선아, 황성수, 양현, 우제석, 오진봉[†]
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, 전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500, 55365

Comparative Evaluation on Sperm Parameter of Transgenic Pigs with General Pigs

Sang Hyoun Park, Gunsup Lee, Joo Yung Lee, Kyung Woon Kim, Sung-June Byun, Sun A Ock, Seongsoo Hwang, Hyeon Yang, Jae-Seok Woo and Keon Bong Oh[†]

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, 1500, Kongwipatjwi-ro, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55365, Korea

ABSTRACT

Pig has been known to be one of the most feasible animals as a bioreactor to produce pharmaceuticals in milk and as a mediator in xenotransplantation research. Previously, we generated transgenic pigs for both purposes, which were expressing Factor 8, vWF, hTPA, and hEPO in milk, along with expression of MCP at GalT gene locus ($\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$) as well as expressing MCP at GalT gene loci with CD73 expression ($\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$). In this study, we performed comparative analyses of sperm parameters between wild type male (WT) pig and those transgenic males to examine the effects of transgenes integrated into the pigs on motility, morphology, viability, and acrosome integrity of the spermatozoa. Our results showed that the rates of actively motile spermatozoa of WT, Factor 8, vWF, hTPA, hEPO, $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$, and $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pigs were 85.0%, 83.3%, 82.5%, 83.3%, 82.5%, 77.5%, and 78.7%, respectively. Whereas, the rates of morphologically normal spermatozoa of WT, Factor 8, vWF, hTPA, hEPO, $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$, and $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pigs were 90.0%, 80.0%, 80.0%, 83.3%, 85.0%, 91.8%, and 80.8%, respectively. In addition, the viability in spermatozoa of WT, Factor 8, vWF, hTPA, hEPO, $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$, and $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pigs were 93.9%, 82.4%, 89.9%, 83.9%, 87.4%, 92.8%, and 83.6%, respectively. The rates of spermatozoa with normal acrosome integrity in WT, Factor 8, vWF, hTPA, hEPO, $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$, and $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pigs were 98.1%, 98.6%, 98.6%, 98.7%, 98.1%, 99.5%, and 95.1%, respectively. There were no significant differences in motility, morphology, viability, and acrosome integrity of the spermatozoa among WT, Factor 8, vWF, hTPA, and hEPO, $\text{GalT}^{\text{MCP}/+}/\text{CD73}$, and $\text{GalT}^{\text{MCP}/\text{MCP}}$ pigs. These mean that neither random integration nor targeted integration of the transgene into chromosome of pig effect on characteristics of spermatozoa. Ultimately, the transgenic male pigs subjected in this study could apply to propagate their progenies for production of human therapeutic proteins and advancing the xenotransplantation research.

(Key words: Acrosome integrity, Morphology, Motility, Transgenic pigs, Viability)

서론

생쥐에서 최초로 형질전환 포유 동물 생산 기술이 개발된 이래(Costantini와 Lacy, 1981; Gordon과 Ruddle, 1981), 우수한 형질을 가진 개체 또는 목적에 따라 특정 형질이 추가된 토끼, 소,绵양 및 돼지 생산이 가능하게 되었다(Hammer등, 1985; Kato등, 1998; Wall 등, 1985). 특히 돼지는 사람과 해부

학적 및 생리학적 특성이 유사하여 이종장기 이식을 위한 모델 동물(Cooper, 2012)과 세대 간격이 짧고, 산자수가 많기 때문에 유증으로 의약품 단백질 생산을 위한 bioreactor 동물로 활용이 유리하다고 알려져 있다(Wall 등, 1991).

본 연구팀에서도 돼지의 유증으로 적혈구 생성을 촉진하여 빈혈 치료제로 사용이 가능한 사람 Erythropoietin(hEPO)을 분비하는 형질전환 돼지(이 등, 2002)를 개발하였고, 혈우병

[†] Correspondence: Keon Bong Oh
Phone: +82-63-238-7254
E-mail: keonoh@korea.kr

치료제로 사용이 가능한 사람 Factor 8(F8)과 Von Willebrand factor(vWf)를 분비하는 형질전환 돼지, 혈전용해제로서 사용할 수 있는 사람 Tissue plasminogen activator(TPA)를 분비하는 형질전환 돼지를 각각 개발하였다. 또한 이종장기 이식용을 활용하기 위하여 초급성 거부반응 유발 유전자인 alpha 1,3-galactosyltransferase(GalT) 유전자 좌위에 보체 조절 단백질의 하나인 membrane cofactor protein 유전자 발현 벡터가 삽입된 형질전환 돼지(GalT^{MCP⁻/MCP⁻}, Hwang 등, 2013; Ko 등, 2013)와 CD73 돼지(Lee 등, 2017)를 개발하였다.

원조 동물(founder animal)로서 개발된 형질전환 동물을 활용하기 위해서는 후대 증식 및 계통 조성 과정이 필요하게 되며, 이 기간을 단축시키기 위해 원조 동물 개발로서 수컷을 선호하게 된다. 이를 위한 번식 방법으로 인공수정이나 자연교배를 실시하게 되는 데, 정액 및 정자의 정상 분석 및 평가를 통한 수정능력 검증은 필수적인 과정이다. 또한 생리적 활성이 높은 물질 발현하는 형질전환 동물에서 정자 기능 이상 등의 원인으로 번식 장애가 빈번하게 보고 되고 있어(Rexroad 등, 1989; Pursel 등, 1990; Bartke 등, 1992; Meliska와 Bartke, 1997; Maleszewski 등, 1998), 유증으로 의약품 단백질 유전자가 발현 생산을 목적으로 개발한 형질전환에서도 정자 정상 분석이 요구되지만, 이와 관련된 연구 결과의 보고가 거의 없는 실정이다. Wolf (2009)에 의해 제안된 정자의 수정능력 평가 항목인 정자 형태, 운동성, 생존성 및 침체 형태를 일반돼지의 것과 비교 및 분석한 결과 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

본 연구팀에서 보유하고 있는 의약품 단백질 생산 목적으로 생산된 hEPO, Factor 8, vWf, htPA 형질전환 돼지와 더불어 이종이식에 활용할 목적으로 개발된 GalT^{MCP⁻/MCP⁻} 형질전환 돼지, 및 이 돼지와 CD73 돼지의 교배로 생산된 GalT^{MCP⁺/CD73} 돼지의 정자 정상 분석을 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 이용 및 정액 채취

공시 종모돈은 축산과학원에서 보유하고 있는 형질전환 Factor8, vWf, htPA, hEPO, GalT^{MCP⁺/CD73}, GalT^{MCP⁻/MCP⁻} 돼지 그리고 일반돼지(Wild type, WT)를 포함하여 총 17두를 실험에 공시하였다. 실험돈의 정액 채취는 수압법으로 이용하였고, 채취 전 종모돈의 포피 및 음경을 증류수로 세척한 뒤, 필터를 부착한 500 ml 돼지정액 전용 채취용 컵을 이용하였다. 채취된 정액은 30분 내로 실험실로 옮겼다. 옮겨진 형질전환 돼지정액은 Androhep[®] plus (Minitube, Germany) 희석제를 이

용하여 1:1로 희석한 뒤 정자 정상 분석을 실시하였다.

2. 정자 형태 평가

정자의 형태는 Diff-Quik (SYSMEX, Kobe, Japan) 염색법을 이용하여 400배 렌즈의 시야에서 최소한 200개의 정자를 광학현미경 (OLYMPUS BX51TF, Tokyo, Japan)으로 기형정자를 관찰하였다. 정자 형태 평가는 Gadea 등(2004)의 방법에 따라 수행하였다.

3. 정자 운동성 평가

살아있는 정자의 운동성은 앞으로 진행하는 운동성을 보이는 전진운동성 (progressive motility)을 광학현미경 (200배 렌즈; OLYMPUS BX51TF, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. 운동성의 평가를 위해 10μl 정액을 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮어 6개의 다른 시야에서 정자 운동성을 평가하였다.

정자 운동성 평가는 Rahman 등(2016)의 방법에 따라 수행하였다.

4. 정자 생존성 평가

정자의 생존성은 SYBR-14/PI(Live/Dead[®] Sperm Viability Kit (L-7011), Invitrogen)를 이용하여 평가하였다. 정액 100μl에 5μl SYBR와 5μl PI를 첨가하여 염색한 뒤, 염색된 시료를 10μl를 슬라이드 위에 떨어뜨려 정액 smear를 만들었다. 정액 smear를 말린 후 200배 시야에서 최소한 200개의 정자를 488 nm excitation filter(녹색)와 635 nm barrier filter(빨간색)가 장착된 역상 형광현미경 (Leica DMI 6000B, Germany)으로 분석하였다. 녹색으로 염색된 정자는 살아있는 정자로, 빨간색으로 염색된 정자는 죽은 정자로 평가하였다. 정자 생존성 평가는 Park과 Yu(2015)의 방법에 따라 암실에서 수행하였다.

5. 침체 온전성 평가

정자의 침체 검사방법은 정액 10 μl를 글라스 슬라이드에 떨어뜨려 얇게 도포한 후 air-dry 한 후, Methanol 용액에 고정하였다. 고정된 슬라이드에 100 μl/ml Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (Sigma Aldrich L-0770, USA)의 20μl를 떨어뜨린 후 Parafilm으로 도포한 뒤 15분동안 염색하였다. 염색된 슬라이드는 15분간 증류수에 담가둔 뒤, 꺼낸 후 건조하였다. 건조시킨 슬라이드는 488 nm excitation filter가 장착된 역상 형광현미경 (Leica DMI 6000B, Germany)을 이용하여 분석하였다. 침체 온전성 평가는 Aboagla와 Terada (2003)의 방법에 따라 암실에서 수행하였다.

6. 통계 자료 분석

본 연구 결과는 평균±표준오차로 나타냈으며, 이에 대한 통계분석은 Graphpad Prism 5 프로그램의 1 way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test를 이용하여 유의차 검정을 실시 하였다. *p*값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다 (*p* < 0.05).

결과 및 고찰

돼지는 번식기간이 짧으며 다태 동물이라는 장점과 사람과 생리 해부학적으로 유사한 장점이 있어 유증과 의약용으로 사용할 수 있는 단백질을 생산하려는 목적과 영장류에 세포와 조직 및 장기 이식에 활용하기 위한 목적으로 형질전환 연구가 활발히 진행되고 있다. 그런데, 형질전환으로 개발된 원조 (founder) 돼지로부터 자연 교배를 통해 자손을 생산하는 번식 능력의 지표로 번식 능력을 확인 할 뿐 대부분의 연구에서 수컷의 정자의 성상 분석을 실시하지 않아, 본 연구에서는 의약용 단백질을 유증으로 생산하기 위하여 개발된 돼지와 이종이식에 활용할 목적으로 생산한 수컷돼지에서 도입한 유전자가 정자의 성상에 미치는 영향성을 분석하고자 실시하였다.

일반적으로 정자의 운동성과 정자막의 온전성(Gadega 등, 1998) 및 첨체 온전성(Waberski 등, 2005) 등은 정자의 수정

능력을 평가하고 예측하는 지표로 활용되고 있는데, 이중에서 정자의 운동성은 수태지의 정자품질(Britt 등, 1999)과 수정능력(Flowers, 1997)을 평가하는 매우 유용한 지표로 이용되며, 정자의 운동성이 60% 이하일 경우 수태율이 저하된다고 보고되었다(Britt 등, 1999; Johnson 등, 2000). 이에 본 연구에서 유증으로 사람 단백질을 분비하는 형질전환 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지와 이종이식 연구를 위해 개발된 형질전환 GalT^{MCP/+}/CD73, 및 GalT^{MCP/MCP} 수컷 돼지와 대조군으로 WT 돼지로부터 정액을 채취하여 재료 및 방법에서 제시한 것처럼 전진 운동성 분석을 실시하였다. Figure 4A와 같이 보이는 것처럼 운동성은 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지에서 각각 83.3%, 82.5%, 83.3%, 82.5%, 그리고 GalT^{MCP/+}/CD73, 및 GalT^{MCP/MCP} 수컷 돼지에서 각각 77.5%, 78.7%로 WT의 85.0%와 통계적인 유의적 차이는 발견되지 않았다.

정자의 형태적 이상을 분석한 결과 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지에서 각각 80.0%, 80.0%, 83.3%, 85.0%, 그리고 GalT^{MCP/+}/CD73, 및 GalT^{MCP/MCP} 수컷 돼지에서 각각 91.8%, 80.8%로 정상의 형태를 가진 정자로 판명되었으며, WT의 90.0%와 통계적인 유의적 차이는 발견되지 않았다 (Figure 1 및 4B). 정자 형태는 정자의 수명, 계절의 변화, 암 돼지 관리와 같은 여러 다른 요인들의 의해 민감하게 변한다고 알려 있지만 (Weitze, 2012), 본 연구에서 정액을 채취한

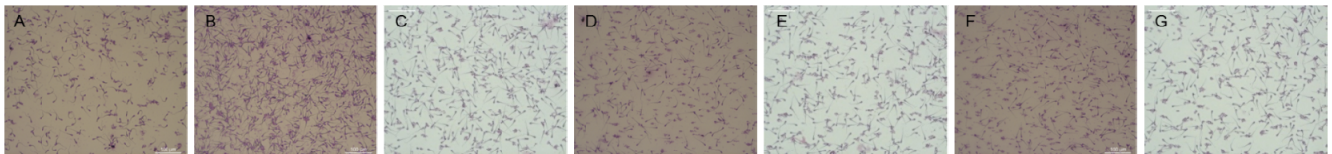


Figure 1. Analysis of morphological abnormality in spermatozoa of transgenic pigs by using Diff-Quik staining. Factor 8 pig (A), vWF pig (B), htPA pig (C), hEPO pig (D), GalT^{MCP/MCP} pig (E), GalT^{MCP/+}/hCD73 pig (F), WT pig (G).

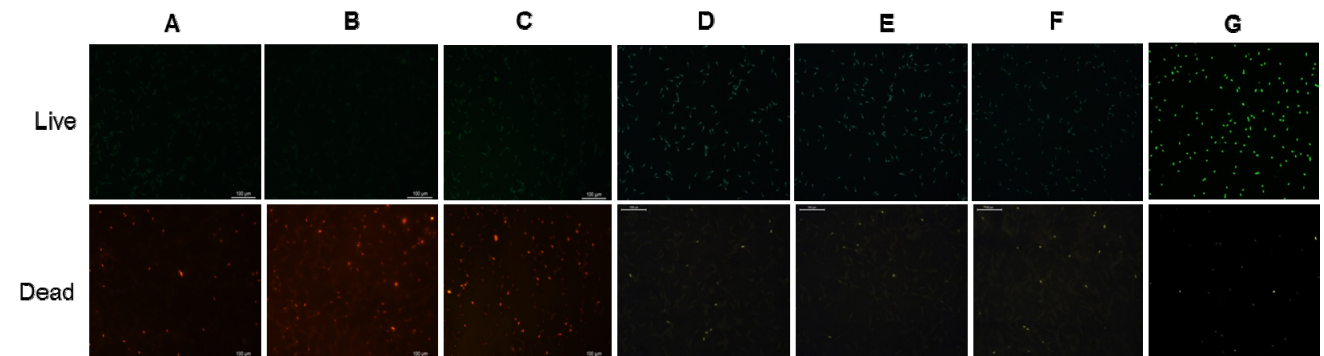


Figure 2. Analysis spermatozoa viability. Spermatozoa of WT and transgenic pigs were stained with SYBR 14 and PI dyes to distinguish live and dead spermatozoa. The green color stained by SYBR 14 means live spermatozoa, while red color stained by PI means dead spermatozoa. Factor 8 pig (A), vWF pig (B), htPA pig (C), hEPO pig (D), GalT^{MCP/MCP} pig (E), GalT^{MCP/+}/hCD73 pig (F), WT pig (G).

시기와 돼지 관리 상태가 수컷 돼지에 적당한 것으로 판단되며, 도입된 유전자의 발현은 정자의 형태에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

정자의 생존성을 분석한 결과 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지에서 각각 82.4%, 89.9%, 83.9%, 87.4%, 그리고 $\text{GalT}^{\text{MCP}^+}/\text{CD73}$, 및 $\text{GalT}^{\text{MCP}^-/\text{MCP}}$ 수컷 돼지에서 각각 92.8%, 83.6%로 정상의 형태를 가진 정자로 판명되었으며, WT의 93.9%와 통계적인 유의적 차이는 발견되지 않았다(Figure 2 및 4C). 높은 수준의 생존성을 보고한 Zou와 Yang(2000)의 93.2%와 본 연구의 WT의 93.9%와 차이가 없었으며, WT과 형질전환 돼지 정자의 생존성에서 유의적 차이가 없었으므로, 정자 생존성은 본 연구에 공시된 형질전환의 영향에 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

형질전환 돼지정자의 침체 온전성은 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지에서 각각 98.6%, 98.6%, 98.7%, 98.1%이었고, $\text{GalT}^{\text{MCP}^+}/\text{CD73}$, 및 $\text{GalT}^{\text{MCP}^-/\text{MCP}}$ 수컷 돼지에서는 각각 99.5%, 95.1%로 정상의 형태를 가진 정자로 판명되었으며, WT의 98.1%와 통계적인 유의적 차이는 발견되지 않았다(Figure 3 및 4D). 이러한 결과는 Zou와 Yang(2000)의 일반 돼지 결과 94.8%와 비슷하거나 좀 더 높은 침체 온전성을 보여주었지만, 보존 온도와 기간 차이에 의해 감소된다고 보고하였으므로, 보존 온도와 보존 기간을 세분화하여 형질전환 돼지 정자의 침체 온전성이 변하는 양상의 추가 분석이 필요하다고 생각된다.

본 연구에 공시된 형질전환 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 돼지는 미세주입 방법으로 생산된 후대이며, $\text{GalT}^{\text{MCP}^+}/\text{CD73}$, 및 $\text{GalT}^{\text{MCP}^-/\text{MCP}}$ 돼지는 체세포의 핵 치환에 의한 복제 방법으로 생산된 개체의 후대이다. 배 등(2007; 2009)은 복제 방법으로 생산된 소와 일반 소의 정자 운동성을 분석했을 때, 복제소에서 유의적으로 높았고 정상적으로 후대를 생산하였다고 보고하였다. 복제 방법으로 생산된 GalT 유전자 녹아웃 돼지(Ahn 등, 2011)의 정자 분석을 실시하지 않았지만, 자연교배 방법으로 후대를 생산(황 등, 2012)하였기에 정상적인 번식능력이 있는 것으로 판단된다. Figure 4의 결과와 이전의 연구 보고를 유추해 보면, 적어도 형질전환 돼지를 생산하기 위하여 사용된 미세주입 방법과 복제 방법은 돼지 정자에 정상

에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Figure 1 및 4B에 나타난 것과 같이 형질전환 돼지의 정상적인 형태의 정자 비율은 80% 이상으로 WT의 비율과 유의적인 차이를 발견할 수 없었다. Alm 등(2006)은 형태적으로 30% 이상의 비정상적인 정자를 인공수정에 이용했을 때 재발정이 발생하는 비율이 크게 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분석한 정자의 운동성, 형태, 생존성 및 침체의 온전성 항목에서 형질전환 돼지와 WT 돼지 간 차이가 발견되지 않았으므로, 이를 바탕으로 본 연구에 공시된 형질전환 돼지의 정자를 이용한 후대번식은 새로운 유전자원으로서 보존과 실제 개발 목적에 따라 활용하기 위한 증식에 사용될 수 있는 방법의 하나라고 생각된다.

최근의 연구에서 Hwang 등(2017)은 GalT 동형접합 녹아웃 돼지의 정자 성상을 개체 별로 분석한 결과 일부의 개체에서 비 정상을 보여 후대 번식에서 제외해야 한다고 제안하였다. 이는 도입된 유전자의 발현이 정자의 성상에 영향을 미치지 않더라도, 개체간 차이가 있을 수 있다는 것을 보여준다. 한편, Zheng 등(2008)은 형질전환 생쥐의 장기간 후대를 분석한 결과 도입된 유전자가 최소한 20세대까지 유전되며 발현도 유지되지만, 그 발현 수준은 개체간 차이를 보인다고 보고하였다. 이는 형질전환 돼지의 정자 성상이 개체간 발현 수준에 따라 차이가 있을 수 있다는 가능성을 보여주는 결과이다. 본 연구에서 분석된 돼지의 개체 수는 각 유전자 형에 따라 2-3 두를 공시하였다. 실제 특정한 목적에 따라 개발한 형질전환 돼지를 그 목적에 맞게 활용하기 위해서는 축군 조성이 필수적이다. 본 연구에 공시된 돼지의 성상은 모두 정상으로 판명되어 각각 도입된 유전자의 영향은 미미한 것으로 판단되지만, 더 많은 수의 형질전환 개체의 정자 성상을 분석하여 도입된 유전자에 따라, 또는 개체에 따라 차이가 없는지 추가 분석이 필요하다고 생각된다.

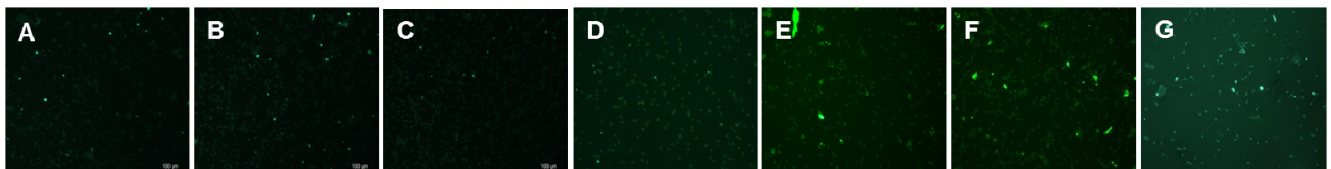


Figure 3. Analysis of acrosome integrity of spermatozoa. Spermatozoa of WT and transgenic pigs were stained with by FITC-PSA. The green color stained spermatozoa indicates morphologically normal acrosome. Factor 8 pig (A), vWF pig (B), htPA pig (C), hEPO pig (D), $\text{GalT}^{\text{MCP}^-/\text{MCP}}$ pig (E), $\text{GalT}^{\text{MCP}^+}/\text{hCD73}$ pig (F), WT pig (G).

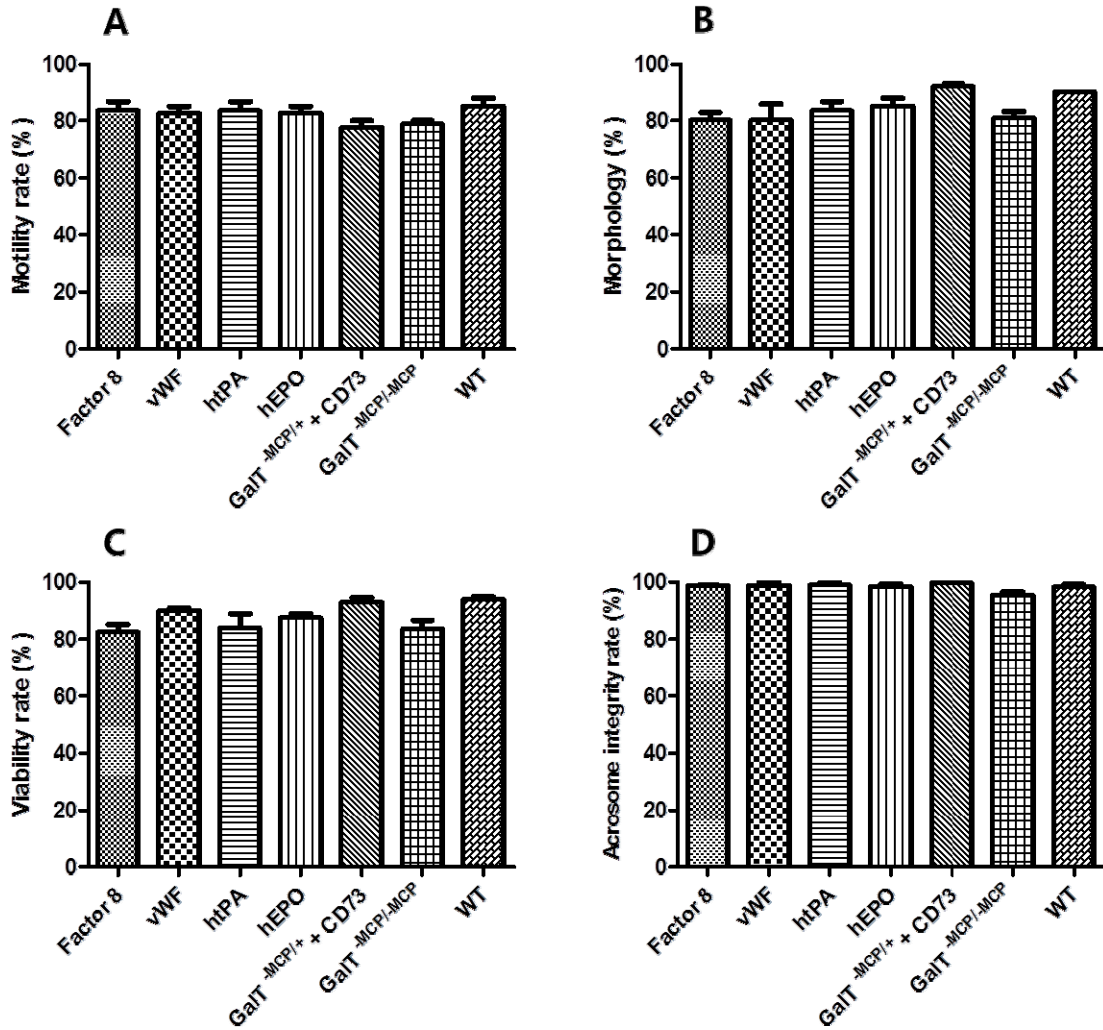


Figure 4. Comparative analyses of sperm parameters, motility (A), morphology (B), viability (C) and acrosome integrity (D) of transgenic pigs subjected in this experiment. The genotypes were indicated below each graph. The data represent mean \pm SE.

결론

본 연구는 형질전환 돼지에 도입된 외래 유전자가 돼지 정자의 기능적 이상을 나타내는지에 대해 알아보고자 실시하였다. 유즙으로 사람 단백질을 분비하는 형질전환 Factor 8, vWF, hTPA, hEPO 수컷 돼지와 이중이식 연구를 위해 개발된 형질전환 GalT^{MCP1+/+}/CD73, 및 GalT^{MCP1-MCP} 수컷 돼지와 대조군으로 WT 돼지로부터 정액을 채취하여 정자의 운동성, 형태, 생존성, 침체 온전성을 분석한 결과 WT 돼지와 통계적인 유의성이 발견되지 않았다. 이는 적어도 본 연구에 공시된 돼지에 도입된 유전자는 정자 성상에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며, 본 연구에 공시된 형질전환 돼지는 정자를 이용한 후대번식 통해 새로운 유전자원으로서 보존과, 실제 개

발 목적에 따라 활용하기 위한 증식에 활용이 가능하다고 생각된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 바이오장기용 형질전환 돼지 생산 및 계통 조성, 세부과제번호: PJ01094403)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- 배성훈, 양병철, 고응규, 오건봉, 성환후, 민관식, 박응우, 박수봉, 황성수. 2009. 체세포 복제 한우 수송아지의 성장 특성과 번식생리적 변화. *한국수정란이식학회지* 24:177-182.
- 배성훈, 황성수, 양병철, 고응규, 김동훈, 임기순, 최화식, 진동일, 양보석, 성환후. 2007. 체세포 복제 한우 수소의 정액 성장, 정자의 활동성 및 수정 능력 분석. *한국동물번식학회지* 31:139-143.
- 이연근, 박진기, 민관식, 이창현, 성환후, 전익수, 임석기, 양병철, 임기순, 장원경, 김진희, 이훈택, 정길생. 2002. 사람 조혈인자 유전자 (Human Erythropoietin Gene)를 도입한 형질전환돼지 생산. *한국동물번식학회지*. 26:95-104.
- 황성수, 오건봉, 김동훈, 우제석, 심호섭, 윤익진, 박진기, 임기순. 2012. $\alpha 1$, 3-Galactosyltransferase (GalT) 유전자가 완전 Knock-out (-/-) 된 바이오장기용 형질 전환 돼지 생산. *한국수정란이식학회지*. 27:9-14.
- Aboagla EM and Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69:1245-1250.
- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB and Shim H. 2011. Resurrection of an α -1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
- Alm K, Peltoniemi OA, Koskinen E and Andersson M. 2006. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reprod. Domest. Anim.* 41:210-213.
- Bartke A, Naar EM, Johnson L, May MR, Cecim M, Yun JS and Wagner TE. 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J. Reprod. Fertil.* 95:109-118.
- Britt JH, Almond GW and Flowers WL. 1999. Diseases of the reproductive system. In: Strae B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds), *Disease of Swine*, 8th edn. Blackwell Science Ltd, Ames, IA, p. 905.
- Cooper DK. 2012. A brief history of cross-species organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 25:49-57.
- Costantini F and Lacy E. 1981. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* 294:92-94.
- Flowers WL. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52:67-78.
- Gadea J, Matás C and Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54:95-108.
- Gadea J, Sellés E, and Marco MA. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod. Domest. Anim.* 39:303-308.
- Gordon JW and Ruddle FH. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD and Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680-683.
- Hwang IS, Lee SC, Kim SW, Kwon DJ, Park MR, Yang H, Oh KB, Ock SA, Woo JS, Im GS and Hwang SS. 2017. Analysis of Semen Parameters in α 1,3-Galactosyltransferase-/- Boars. *J. Emb. Trans.* 32:53-58.
- Hwang S, Oh KB, Kwon D-J, Ock S-A, Lee J-W, Im G-S, Lee S-S, Lee K and Park J-K. 2013. Improvement of cloning efficiency in minipigs using post-thawed donor cells treated with roscovitine. *Molecular biotechnology* 55:212-216.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Ko N, Lee J-W, Hwang SS, Kim B, Ock SA, Lee S-S, Im G-S, Kang M-J, Park J-K and Jong Oh S. 2013. Nucleofection-Mediated $\alpha 1$, 3-galactosyltransferase Gene Inactivation and Membrane Cofactor Protein Expression for Pig-to-Primate Xenotransplantation. *Animal biotechnology* 24:253-267.
- Lee SC, Lee HS, Oh KB, Hwang IS, Yang H, Park MR, Ock SA, Woo JS, Im GS and Hwang SS. 2017. Production and Breeding of Transgenic Cloned Pigs Expressing Human CD73. *Dev. Reprod.* 21:157-165.
- Maleszewski M, Kuretake S, Evenson D, Yanagimachi H, Bjordahl J and Yanagimachi R. 1998. Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine. *Biol.*

- Reprod. 58:8-14.
- Meliska CJ and Bartke A. 1997. Copulatory behavior and fertility in transgenic male mice expressing human placental growth hormone gene. *J. Androl.* 18:305-311.
- Park SH, and Yu IJ. 2015. Evaluation of toxicity of green tea extract in chilled boar spermatozoa. *J. Emb. Trans.* 30:1-6.
- Pursel VG, Bolt DJ, Miller KF, Pinkert CA, Hammer RE, Palmiter RD and Brinster RL. 1990. Expression and performance in transgenic pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40:235-245.
- Rahman Md A, Park SH, and Yu IJ. 2016 Effect of monosaccharides in glycerol-free tris extender on reactive oxygen species and apoptosis in dog sperm cryopreservation. *Cryoletters.* 38:51-57.
- Rexroad CE Jr, Hammer RE, Bolt DJ, Mayo KE, Frohman LA, Palmiter RD and Brinster RL. 1989. Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol. Reprod. Dev.* 1:164-169.
- Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF and Töpfer-Petersen E. 2005. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 63:470-484.
- Wall RJ, Pursel VG, Shamay A, McKnight RA, Pittius CW and Hennighausen L. 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88:1696-1700.
- Wall RJ, Pursel VG, Hammer RE and Brinster RL. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.* 32:645-651.
- Weitze KF. 2012. The importance of boar sperm motility and morphology for fertility, *International Pig Topics. East Yorkshire* 27:13-15.
- Wolf J. 2009. Genetic parameters for semen traits in AI boars estimated from data on individual ejaculates. *Reprod. Domest. Anim.* 44:338-344.
- Zheng ZY, Oh KB, Koo DB, Han YM and Lee KK. 2008. Expression of the Transgene is Consistently Inherited to High Numbers of Generations and Independent on Its Source. *Reprod. Dev. Biol.* 32:39-43
- Zou CX and Yang ZM. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology* 53:1477-1488.
-
- Received August 08 2017, Revised September 12 2017,
Accepted September 15, 2017