

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000150-01

우수 사슴 녹용 세포를 이용한 생리활성물질의 생산과
핵이식수정란 이식 기술 개발

Development of transplant technique of cloned embryo and
production of physiological activity material
using antler velvet cell of deer

바이오컬처(주)

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “우수 사슴녹용세포를 이용한 생리활성물질의 생산과 핵이식 수정란이식 기술 개발(Development of transplant technique of cloned embryo and production of physiological activity material using deer antler velvet cell)” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 1일

주관연구기관명 : 바이오컬처(주)

주관연구책임자 : 이 장 희

세부연구책임자 : 이 장 희

연 구 원 : 백 순 화 (백 석 대 학 교)

연 구 원 : 이 주 형 (바이오컬처(주))

연 구 원 : 허 태 영 (국립축산과학원)

연 구 원 : 박 성 재 (소변식아카데미)

연 구 원 : 최 순 옥 (바이오컬처(주))

연 구 원 : 정 결 (바이오컬처(주))

연 구 원 : 황 동 국 (바이오컬처(주))

연 구 원 : 박 지 영 (바이오컬처(주))

연 구 원 : 이 우 람 (바이오컬처(주))

협동연구책임자 : 류 범 룡 (중 앙 대 학 교)

연 구 원 : 김 병 각 (중 앙 대 학 교)

연 구 원 : 김 기 중 (중 앙 대 학 교)

연 구 원 : 김 방 진 (중 앙 대 학 교)

연 구 원 : 김 용 희 (중 앙 대 학 교)

연 구 원 : 강 혜 련 (중 앙 대 학 교)

협동연구책임자 : 이 종 완 (공 주 대 학 교)

연 구 원 : 신 민 석 (공 주 대 학 교)

연 구 원 : 이 지 연 (공 주 대 학 교)

요 약 문

우리나라에서 사슴사육은 1955년 대만으로부터 꽃사슴을 수입하면서 본격적으로 시작되었다. 처음 사슴사육은 주로 관상용에서 시작되었으나 경제성장과 더불어 사슴의 주요 생산물인 녹용의 이용량이 크게 증대하게 되어 축산농가의 새로운 소득원으로 자리 잡게 되었다. 우리나라는 세계 최대의 녹용 소비국으로 국내 자급율은 20.0% 수준에 머물고 있어 외국으로부터 수입 의존도가 매우 높은 실정이다. 이는 국내 사슴의 녹용생산량이 외국의 사슴에 비해 낮은 것도 하나의 원인이 된다. 따라서 양질의 녹용 생산량을 증가시키기 위해서는 무엇보다도 사슴의 능력 개량이 요구되나 IMF의 영향에 의해 1997년 이후로는 사슴의 수입이 거의 없는 실정으로 혈통갱신이 어려운 상태에 놓여 있었다. 농가에서 우수한 종록을 보유하고 있다하더라도 자연교미로는 연간 수정할 수 있는 암사슴이 10~15두 정도밖에 되지 않으므로 우수한 종록의 활용성을 높이고, 조기에 능력을 개량할 수 있는 인공수정과 수정란이식 기술개발이 무엇보다도 절실한 시점이다.

사슴은 계절번식동물이며, 발정지속 시간이 다른 동물과 비교하여 매우 짧고, 승가·허용하는 행동을 관찰할 수 있는 기회가 드물기 때문에 자연발정 상태를 관찰하기가 어렵다. 따라서 인공수정과 수정란이식을 위해서는 발정과 다배란을 유기하여 적기에 인공수정 및 이식하는 것이 중요하다

따라서 본 연구는 우리나라의 계절에 알맞은 사슴의 발정동기화 및 다배란 유기 기술을 개발하고, 우수한 종록의 녹용 세포로부터 효율적인 체외배양기술을 확립하여 생리활성물질의 생산과 녹용세포에서 유래한 공여 핵으로부터 복제 수정란 생산과 이식기술을 개발하기 위하여 아래와 같은 연구를 수행하고자 하였다.

- 1) 사슴 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정기술 개발
- 2) 난포란 채란과 체외배양
- 3) 다배란 유기와 수정란이식기술 개발
- 4) 녹용세포에 대한 효율적인 체외배양시스템 개발
- 5) 녹용으로부터 공여 세포 핵 확보 및 세포주 동결보존
- 6) 난포란의 체외배양과 복제수정란 생산
- 7) 복제수정란의 이식기술 개발

본 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 6개 시험참여 농가로부터 엘크 61두를 인공수정하여 70.7%의 수태율 나타내었으며, 분만율은 30% 정도였다.
- 2) 인공수정 후 수정란의 회수율은 70.2~84.9%였으며, 회수된 난포란의 체외성숙율은 75%였다.
- 3) 체내 수정란의 이식 후 분만율은 엘크 33.3%, 꽃사슴 25.0%였다.
- 4) 녹용 세포의 체외 배양에 효과적인 배양 조건과 배양액을 선별하기 위하여 다양한 온도, 산소와 CO₂ 농도 및 배양액(BGJb, DMEM, DMEM/F12, IMDM, MEMa, MSC, RPMI, StemPro)의 효과를 검증한 결과 가장 효율적인 녹용의 Mesenchyme 세포 증식을 위해서는 37°C, 20% O₂, 5% CO₂ 배양 조건에서 기본배양액(MEMa +10% FBS) 내에 supplements 및 bFGF(성장 인자)를 첨가하였을 때 31.0 ± 1.3 배(fold)의 세포증진 효과를 얻을 수 있었다.
- 5) MSC 배양액 이용에 따른 녹용세포의 배양기간별 누적 증식률은 첫 번째 1주차, 2주차, 3주차에서 각각 8.6배, 79.7배, **741.9배**의 세포증식률을 나타내었다.
- 6) 녹용으로부터 공여 세포 핵 확보 및 세포주 동결보존 결과 엘크와 꽃사슴에서 각각 skin, mesenchyme 및 bone 세포주를 확보하고 각각 30~40vial 정도 동결보존하였다.
- 7) 난포란의 체외 배양율은 75% 수준이었으며, 체외 성숙 난포란에 녹용 세포핵을 이식하였을 때 융합율은 90%였으며, 융합된 복제 수정란의 발생율은 75% 수준이었고, 이 중 37.5%가 4-세포기까지 발달하였다. 복제수정란 생산 시 융합 시의 조건은 38.5°C 및 150V, 45us, 2plus 조건에서 4-세포기까지의 발달율은 62.5%였다.
- 8) 4-세포기 복제수정란의 2개씩 발정동기화된 꽃사슴 2두씩에게 외과적 및 비외과적으로 이식하였으나, 분만에 성공하지 못하였다.
- 9) 특허 출원(등록) 및 논문 발표 : 특허출원 4, 특허등록 1건, 논문게재 2, 학술발표 15편을 달성하였다.

상기 결과에서 우수 사슴의 녹용 세포의 체외배양을 통하여 생리활성물질의 생산과 유전자 원으로써의 공여 핵을 이용한 복제수정란 생산에 성공하였으며, 다양한 이식기술을 시도하였으나 분만에 성공하지는 못하였다. 이와 같은 결과는 앞으로 타 축종에서의 우량 가축의 복제기술 적용에 의한 개량 기반 구축과 야생동물의 복원 등에도 크게 기여될 것으로 사료되었다.

SUMMARY

In Korea, deer breeding began in 1955 when spotted deers were imported from Thailand. Originally, deer were imported only for the purpose of decoration, but economic development led to an increase in the consumption of deer velvet antlers. As a result, deer farming was promoted as a new source of income for livestock farmers. However, while Korea has the highest consumption of deer velvet antlers, approximately 20 percent of that demand is supplied by domestic farmers; so the dependency on imports is very great. This phenomenon is caused by the fact that the output of antlers from domestic deer farmers is lower than the output from foreign breeders. Therefore, it is necessary to modify breeding techniques to increase the domestic output of high quality velvet antlers. In particular, there is an urgent need to develop the techniques of artificial insemination(AI) and embryo transfer(ET) and to make efficient use of high quality species. But it is still difficult to apply the techniques developed in other countries because the deer is a seasonal breeding animal. Thus, in Korea it is necessary to develop a technique that is appropriate to the climate of this country.

This study is undertaken in order to develop an estrus and ovulation synchronization technique that is suitable to the Korean climate, to collect and cryo-preserve velvet cell(mesenchyme) from a high quality species, to develop technique for culture of oocytes and velvet cell *in vitro*. and then to use in the production and transfer of cloned embryo of deer controlled reproductively, following studies were conducted.

- 1) Development of technologies for fixed-time artificial insemination(AI) and embryo transfer(ET) from estrus and ovulation synchronization
- 2) Development of technologies for superovulation to produce many of oocyte
- 3) Development of technologies for collection and *in vitro* culture of oocytes
- 4) Development of efficient culture system *In vitro*, technologies for collection and freezing preservation of velvet cell
- 5) Development of technologies for production and transfer of cloned embryo

Results are as a following.

- 1) During project (frist year), a total of 61 herds were inseminated from 6 farms, conception rate were 70.7%, parturation rate wre 30%, respectively.
- 2) MEMa (with 10% FBS, 37°C, 20% O₂, and 5% CO₂ tension as a basic culture conditions) contained the supplements plus bFGF(growth factor) enhanced proliferation of velvet antler cell(31.0 ± 1.3 fold)
- 3) Nuclear and microtuble remodeling and *in vitro* development of nuclear tranferred deer oocytes with vevet antler cell of the flower deer and elk deer were developed to 4-cell stage(62.5%)
- 4) Cloned 4-cells were transferred to the flower deer, the parturation was not succeeded.
- 5) Registration of a patent and paper presentation : 5 and 15

The results indicate that allow continuous proliferation of antler cells *in vitro* established the foundation to basic biology of antler cells and makes possible application to the regenerative medicine in a broad sence.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of study	9
Section 1. Object of research and development	9
Section 2. Necessity of research and development	10
Section 3. Contents and range of research	14
Chapter 2. Current domestic and outside technical status	16
Section 1. Domestic case	16
Section 2. Outside case	17
Chapter 3. Results and contents of research and development	18
Section 1. Maintain of excellent deer(sire) and antler cell collection.....	18
Section 2. Establishment of <i>in vitro</i> culture system of antler cell and cryopreservation	25
Section 3. Establishment of technique of superovulation and <i>in vitro</i> culture of oocytes for production of cloned embryo.....	41
Section 4. Production of cloned embryo derived <i>in vitro</i> cultured oocytes.....	51
Section 5. Establishment of transfer technique of cloned embryo	60
Chapter 4. Attainment of research purpose and contribution to related research field	73
Section 1. Attainment of research purpose.....	73
Section 2. Application plan of obtained research results.....	75
Chapter 5. Application plan of obtained research results	81
Section 1. Results of research	81
Section 2. Contribution to related research field	85
Chapter 6. Foreign information collected during research	89
Chapter 7. References	90
Appendix	
Appendix 1. Annual experimental plan and contents.....	96
Appendix 2. Contents of poster presentation and registration of a patent	106
Appendix 3. Abstracts and application report of obtained research results.....	115
Appendix 4. Postscript of Research (Acknowledgement).....	127

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	9
제 1 절	연구개발의 목표	9
제 2 절	연구개발의 필요성	10
제 3 절	연구 개발의 내용과 범위	14
1.	연차별 연구개발의 목표 및 내용.....	14
2.	세부(협동)과제별 연구 내용과 범위.....	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내 현황	16
제 2 절	국외 현황	17
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	18
제 1 절	우수 종육의 확보 및 녹용 세포 수집	18
1.	종육의 확보 및 사양관리	18
2.	핵이식 수정란 생산을 위한 공여핵 세포 확보.....	19
3.	정액 채취 및 동결정액 제조.....	20
4.	결과.....	22
제 2 절	녹용의 세포배양기법 확립과 동결보존.....	25
1.	녹용 및 육경 세포의 대량 생산을 위한 체외배양시스템 개발.....	25
2.	녹용세포의 체외배양/증식을 위한 배양액의 효과 검증.....	29
3.	녹용세포의 체외배양 효율 증식 조건 검증.....	35
4.	녹용세포로부터 생리활성물질의 생산과 조직특이 세포주 확립.....	37
5.	세포주의 효율적인 동결보존 기법 개발.....	39
제 3 절	핵이식 수정란 생산을 위한 다배란 처리 및 난포란의 체외성숙기술 확립.....	41
1.	발정동기화 및 다배란 처리.....	41
2.	난포란 채란과 체외 성숙.....	42
3.	통계 처리.....	47
4.	결과.....	47
제 4 절	체외성숙 난포란으로부터 핵이식 수정란의 생산.....	51
1.	복제 수정란 생산을 위한 공여핵 세포 및 성숙 난포란 준비.....	51
2.	복제 수정란 생산을 위한 세포 융합 결과.....	53
3.	사슴 난포란의 체외 수정 결과.....	60

제 5 절	핵이식 수정란(복제)의 이식 기술 확립	60
1.	사슴의 인공수정 기술 확립	60
2.	사슴의 수정란이식 기술 확립	63
3.	사슴의 복제 수정란이식 기술 확립	65
4.	사슴의 임신진단 기술 확립	66
5.	결과	66
제 4 장	목표달성도 및 관련 분야에의 기여도	73
제 1 절	연도별 연구개발 목표의 달성도	73
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	75
1.	논문 발표(2편)	75
2.	특허 출원 및 등록(5건)	76
3.	학술발표(15편)	77
4.	박람회(전시회) 출전(3회)	78
5.	박람회(전시회) 참관(3회)	79
제 5 장	연구개발성과 및 성과활용계획	81
제 1 절	연구개발 성과	81
1.	연구성과 목표 대비 성과(달성)	81
2.	연구 성과 실적	81
3.	홍보 실적(박람회 또는 전시회 참가)	84
제 2 절	연구 성과 활용 계획	85
1.	연구 성과 활용 목표 및 실적 대비	85
2.	연구 성과 활용 계획	85
3.	제품 및 시장 분석	86
4.	3P(특허, 논문, 제품) 분석을 통한 연구 추진 계획	88
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	89
제 7 장	참고문헌	90
부록		96
1.	연도별 실험 추진 내역	96
2.	학술 발표 및 특허등록 내역(사본)	106
3.	연구개발보고서 초록 및 연구성과활용결과 보고서	115
4.	연구 수행 후기 (감사의 글)	127

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목표

사슴 산물인 녹용은 한약재로써 아시아 권역에서 많이 소비되고 있는 실정이나 그 대부분도 우리나라에서 가장 많이 소비되고 있다. 그러나 국내 소비량의 70% 이상은 수입에 의존하고 있는 실정이며 최근에는 녹용의 산업적 가치가 세계적 주목을 일으켜 사슴 산업의 세계적 우위 다툼이 매우 치열한 실정이다. 이미 뉴질랜드에서는 국가적으로 연구 지원하여 레드디어 녹용세포를 복제하여 새끼를 얻는 시대를 열어가고 있는 기술 수준이며(Berg 등, 2007), 각 국(뉴질랜드, 호주, 캐나다, 미국 등)의 가장 큰 수출시장은 한국으로 우리나라 사슴산업(녹용 소비량의 80% 수입 의존)을 심각하게 위협하고 있는 실정이다. 녹용 소비가 집중되어 있는 시장 특성상 외국의 수입량에 의존할 수밖에 없으며 가격 경쟁에서도 국내 농가와의 격차가 점점 심해지는 추세이다.

국내 사슴 사육농가는 2007년 말 7,937농가이며, 사육두수는 97,856두로 이들로부터 생산되는 녹용 생산량은 건녹용 기준 약 17만 5천 kg으로 국내 전체 소비량의 약 20%정도를 차지하고 있다. 국내 사슴의 품종별 녹용생산량에 대한 비율은 꽃사슴 : 레드 : 엘크가 1 : 3 : 7로 엘크의 녹용생산량이 가장 많다. 국내 사슴의 대부분은 자연교미에 의해서 번식이 이루어지고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내 우수 사슴의 활용을 통하여 첨단 생명공학기법을 통한 사슴의 녹용세포의 체세포 배양과 핵이식 수정란의 생산과 이식 기술을 적극 개발하여 국내 사슴 자원을 이용한 고부가가치 산업기반을 구축하고자 하였다. 사슴의 인공수정과 수정란이식은 국내 사슴의 개량과 번식효율은 증진시키기 위한 수단으로써 이의 기술개발로, 최근에는 매년 약 500두 이상 인공수정됨으로써 국내 보급율은 약 1% 수준으로 추정되고 있다. 그러나 아직 수정란이식은 상업화되고 있지 못하며, 특히 복제수정란 생산 및 이식은 시도조차하고 있지 못한 상태였다.

본 연구에서는 녹용 세포에서 생리활성물질 추출하고 제외배양시스템을 구축하여 대량생산기반을 마련하고 개량 및 번식효율 증진을 위하여 인공수정 및 수정란이식 관련 기술의 확립으로 우수 사슴 녹용세포를 이용한 복제수정란 생산 및 이식기술 기반을 마련하여 양육농가의 소득증대 및 국내 사슴 자원을 이용한 고부가가치 양육산업의 획기적 발전 기반을 구축코자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면

국내 사슴 인공수정은 1997년경 일부 단체나 조합에서 외국의 시술자를 초빙하여 극히 제한적으로 이용되어져 왔으며 일반 농가에서는 사슴의 번식생리에 대한 이해부족으로 인공수정은 엄두도 못 내고 있는 실정이었다. 사슴의 인공수정과 수정란이식은 정액채취와 정액의 동결보존, 암사슴의 발정 및 다배란 유도, 정액주입 또는 체외수정, 수정란이식, 임신진단 등 일련의 과정이 체계적으로 이루어져야 번식효율을 높일 수 있으며 사슴의 생리적 특성상 계절번식성 때문에 이러한 기술 적용으로 수태까지 성공하기가 다른 동물에 비해 매우 어려웠다. 특히 복제수정란 생산 및 이식 기술은 시설 및 장비에 따른 투자비용 부담으로 초보단계에 있었으며, 세계적으로도 Berg 등(2007)에 의해서 처음으로 산자를 얻는데 성공하였다.

가. 국내 사슴 인공수정 및 수정란이식의 기술 개발

사슴의 인공수정, 수정란이식 및 복제수정란 생산을 위한 정액의 동결보존 기술은 1996년 축산기술연구소(현. 국립축산과학원)에서 동결정액 생산에 성공하였으며, 생산된 정액의 질은 외국도입 정액에 비해 전혀 손색이 없으나 다량의 체계적인 생산을 위해서는 추가적인 기술개발 연구가 필요하였다. 한편 사슴 인공수정과 수정란이식에 대해서는 축산기술연구소에서는 1994년부터 축산관련 공무원을 대상으로 가축의 수정란이식과 인공수정에 대한 이론과 실습교육을 실시하였고, 1999년부터 2003년까지 양육농가, 가축인공수정사, 지도직 공무원 등에 대하여 매년 100여명씩 가축의 능력개량과 번식효율 개선을 위한 인공수정 및 수정란이식 교육을 전수하여 우리나라 인공수정 보급률 향상에 기여하였으며, 이를 바탕으로 한 축적된 기술로 사슴의 인공수정 및 수정란이식기술 개발의 잠재력이 매우 높은 수준이라고 할 수 있었다. 이에 2011년 천안지역에서 사슴 수정란이식에 의한 자축 생산이 성공하였고(2011. 이 등), 복제수정란에 의한 자축 생산은 소, 돼지 및 양(염소)에 성공한 사례가 있었을 뿐이었다.

사슴의 능력개량을 위해 우수한 능력(녹용생산량)을 보유하고 있는 종족으로부터 녹용을 생산하고 그 종족의 정액 및 녹용세포로부터 생산된 복제 수정란을 인공수정하거나 복제수정란을 이식할 수 있는 기반을 확립함으로써 개량을 위한 생축 및 정액의 수입비용을 절감하고 사슴사육 농가 및 가축인공수정사 등에 의한 인공수정기술이 일반화된다면 추후 복제수정란을 포함한 수정란이식기술도 몇몇 선각자들에 의해 시술될 수 있도록 기술을 확립할 계획이다.

지금까지 한국 양육협회에서는 매년 우수 사슴 선발대회를 통하여 녹용생산량이 많은 우수 사슴을 선발하고 그 사슴들의 녹용도 함께 매입함으로써 사슴 농가의 소득 보전과 함께 개량을 유도하여 왔다. 그러나 매입된 녹용은 기능성 식품이든 한약재의 원료로만 제공되었을 뿐 그 녹용도 매우 귀중한 유전자원임을 간과하여 왔다. 이에 본 연구에서는 세포배양기법을 통하여 녹용 세포에서 생리활성물질 추출하고 녹용과 같은 성질과 성분을 체외에서도 배양하여 얻을 수 있도록 대량 세포배양시스템을 구현하고자 하였다. 더 나아가 매입된 고능력 종족의 유전자원을 활용하기 위한 방법으로 복제기술을 적용하기 위하여 녹용세포의 핵을 추출하고 이를 체외배양 난자에 탈핵시킨 후 핵이식하여 우수 종족의 복제를 통한 증식으로 개량을 가속화 시킬 수 있는 기반 기술을 개발하는 것이 매우 절실하다고 할 수 있다.

나. 번식 및 개량관련 신기술 개발

사슴은 품종에 따라 번식계절, 발정주기, 임신기간 등이 차이가 있어 번식생리에 대한 구체적인 연구가 필요하다. 즉, 일괄 및 적기 수정을 위하여 발정동기화 기술과 다배란 처리에 의한 대량 난포란 생산 및 핵이식을 통한 복제수정란 생산을 통하여 번식효율의 극대화와 함께 개량을 촉진하여야 할 것이다. 이러한 기술 개발을 위해서는 한국 양육협회에서는 매년 추진하고 있는 우수 사슴 선발대회에서 확보되어진 우수 사슴 녹용의 유전자원으로서의 활용이 매우 절실하고 이를 활용한 복제 수정란의 생산 및 이식기술 확립은 사슴 개량에 획기적인 전기가 마련될 것으로 사료된다.

다. 양육산업의 국제경쟁력 강화

국내에 사슴의 인공수정기반이 조성되었을 경우에는 능력개량 뿐만 아니라 다른 국가에 대한 인공수정기술 이전 및 녹용수출 등이 가능해질 것이다. 캐나다 및 뉴질랜드 등 일부 극소수 국가를 제외하고는 국제적으로 사슴의 동결정액 및 수정란(복제 수정란 포함)을 생산하여 공급하는 산업체가 거의 없는 실정으로 수출전략 및 벤처 사업으로도 가능성이 매우 높다.

특히 사슴은 야생사슴이 가축화되어 체계적인 사양기술이 적용된 것은 10~20년 전에서부터 비롯되었으며, 인공수정과 수정란이식 같은 번식기술은 불과 몇 년 전부터 시작되어 호주, 캐나다 및 뉴질랜드 등의 선진 양육국가에서 전략적으로 개발되어 녹용 최대 소비국인 우리나라를 비롯한 동남아시아지역에 수출전략상품으로 연구 개발되어 오고 있다. 이러한 국제적 추세에 녹용수급의 자급률을 높이기 위해서는 종록 개량 및 녹용생산성 증대를 위한 국가적인 기술개발로 경쟁력을 강화해야 할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 사슴 및 녹용 수입 억제효과

1) 1997년에 수입한 미국 등에서 수입한 사슴은 2,819두로 4,232,486\$의 외화가 지출되었으며, 그 이후 생축 수입은 거의 이루어지지 않았다.

2) 1998년 수입 건녹용각 및 생녹용각은 각각 38톤 및 20톤이었으나 그 중 불량품이 각각 5톤 및 1.7톤으로 외국산 녹용의 질이 우리나라 기준에 미흡한 사례가 있었다고 보고된 바 있고,

3) 1997년에서 1999년까지 국내 녹용 생산량은 소비량의 20.9~32.8% 수준에 해당하므로 사슴 인공수정이 실용화되면 능력개량이 촉진되어 사슴 및 녹용 수입을 억제하는데 기여할 것이다.

나. 국내 양육농가 보호 및 소득기반 안정에 기여

인공수정 및 수정란이식으로 조기에 능력이 개량되어 사슴의 녹용 생산성과 품질이 향상되어 국제경쟁력을 높아지고, 농가 소득이 크게 증대될 것으로 기대된다.

다. 경제성

사슴의 인공수정 및 수정란이식기술이 보급·확대되면 농가에서는 저렴한 비용으로 사슴을 조기에 개량할 수 있고, 가축인공수정사의 활동영역이 넓어져 소득이 보장됨으로서 양육 산업의 발전이 빠르게 이루어질 것이다.

지난날 외국인 시술자에 의해 사슴 인공수정 시 시술료가 800천원~2,500천원으로 농가 부담이 매우 컸다. 국내 가임 암사슴을 54,274두를 외국인 시술자에게 의뢰하여 인공수정시 43,419백만~135,685백만원이 지출되어야하나 국내 기술이 확립되면 16,282백만원(두당 최대 300천원)으로 외국시술자의 37.5% 수준의 비용으로 우수한 사슴을 확보할 수 있다. 인공수정에 의해 능력개량으로 녹용의 생산량을 5kg 증가시킨다면 연간 두당 1,500천원의 수익을 추가로 보장할 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

사슴의 인공수정 및 수정란이식(복제 수정란 포함)기술이 실용화되면 능력개량 효과가 조기에 이루어져 국제경쟁력이 높아짐으로서 양육산업이 안정화 추세로 지속되고, 농가소득이 증대되며, 자연종부에서 비롯될 수 있는 사슴의 만성질병(결핵, 피부병 등) 발생율을 줄일 수 있다. 우리나라는 세계 최대 녹용 소비국이면서도 기술개발의 미진으로 녹용소비의 80% 이상을 수입에 의존하고 있으며, 수입량은 매년 증가추세에 있어 수정란이식기술의 농가보급은 외화지출을 크게 줄일 수 있을 뿐만 아니라 오히려 중국 및 일본으로의 수출전략산업으로 발전할 수 있고, 소비자는 고품질의 녹용을 저렴한 가격으로 구입할 수 있을 것이다.

우리나라에서 사슴사육은 1955년 대만으로부터 꽃사슴을 수입하면서 본격적으로 시작되었다. 그 후 1970년대에 미국, 캐나다, 뉴질랜드, 일본, 대만 등으로부터 레드디어, 엘크 등 1,000여두가 수입됨에 따라 사슴 사육농가와 사육두수가 증가하였다. 처음 사슴사육은 주로 관상용에서 시작되었으나 경제성장과 더불어 사슴의 주요 생산물인 녹용의 이용량이 크게 증대하게 되어 축산농가의 새로운 소득원으로 자리 잡게 되었다. 따라서 양질의 녹용 생산량을 증가시키기 위해서는 무엇보다도 사슴의 능력개량이 요구되나 IMF의 영향에 의해 1997년 이후로는 사슴의 수입이 거의 없는 실정으로 혈통갱신이 어려워지고 있다. 농가에서 우수한 종록을 보유하고 있다하더라도 자연교미로는 종록 1두당 연간 수정할 수 있는 암사슴이 10~15두 정도밖에 되지 않아 자가 개량 수준에 불과함으로 우수한 종록의 활용성을 높이고, 조기에 능력을 개량할 수 있는 수정란이식과 복제수정란 생산기술 개발이 무엇보다도 절실한 시점이다. 그러나 사슴은 소나 돼지와 달리 계절번식을 하는 동물로서 외국에서 개발된 기술을 그대로 접목하기는 어렵다. 우리나라의 계절은 다른 나라와 다르므로 사슴의 번식생리를 이용한 우리나라의 실정에 맞는 기술개발이 무엇보다도 필요하다.

근래에 사슴의 인공수정은 국내 사슴의 개량과 번식효율은 증진시키기 위한 수단으로써 이의 기술 확립으로, 최근에는 매년 약 500두이상 시술됨으로써 국내 보급율은 약 1% 수준으로 추정되고 있다. 일반적으로 사슴은 계절적 다발정성동물로 발정지속기간(우리나라의 경우 9~12월)이 짧고 일조시간이 짧아지는 시기에 발정을 나타내는 단일성 계절번식 동물이다. 사슴

은 생후 8~12개월령에 성숙이 이루어지며 16개월 정도 되면 암수모두 번식에 공용할 수 있다. 이른 봄에 태어난 어떤 품종의 새끼 암사슴은 다음 해 가을이면 정상 발정으로 수태가 용이해 질 수 있으나, 7월 이후 늦게 태어난 사슴은 다음 해에도 수태되기가 어렵게 된다. 사슴은 품종에 따라 일년 내내 발정주기를 되풀이 하는 품종도 있지만 우리나라의 사슴은 계절 번식성이 강한 편이다. 엘크의 경우에는 16개월령에 성숙이 이루어지기 때문에 5~6월에 태어난 개체는 다음해 번식계절에 정상적으로 임신되고 그 다음해에 분만하게 된다. 이 보다 늦게 태어난 개체는 다음해에 수태되기 어렵거나 그 이듬해 늦새끼 분만으로 어미와 새끼 모두 그룹 내에서 위축될 수밖에 없어 지속적인 번식이 어렵게 된다. 사슴 인공수정 및 수정란이식은 암사슴의 발정유도 및 동기화, 정확한 발정확인, 배란시간을 감안한 정액주입, 복제수정란 생산 및 이식, 임신진단 등 일련의 과정이 체계적으로 이루어져야 성공할 수 있으며 축군 전체의 번식효율을 동시에 높일 수 있다.

특히 복제 수정란을 생산하고 이식하기 위해서는 인공수정기술이 정착되고, 더 나아가 수정란이식기술이 안정화 되면 시도할 수 있는 기술이다. 현재 우리나라의 경우에 수정란이식은 몇 번의 성공 경험만 있을 뿐 제대로 기술이 안정화 되지 못하였다. 그러나 획기적 기술 적용에 의하여 그 성공 가능성과 문제 해결을 위한 접근으로 종전 타 축종(소, 돼지 등)에서 적용하고 있는 복제기술을 빠르게 접목하기 위하여 사슴 녹용세포를 이용한 체세포복제기술의 적용 및 개발은 유전자원의 확대 이용과 개량 가속화로 매우 시의 적절하다고 할 수 있다.

제 3 절 연구개발의 내용과 범위

1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2010	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발 ○ 녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 품종별 종족의 기본 사양을 통한 녹용세포 수집 및 배양 <ul style="list-style-type: none"> - 우수 종족(엘크 및 꽃사슴 각 3두)으로부터 특정 세포 추출 ○ 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 수정란 이식 기초기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 수정란 이식 ○ 사슴의 품종별 녹용세포 수집 및 배양시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 체외배양시스템 개발을 위하여 다양한 배양 조건의 효율을 검증함
2차년도	2011	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발 ○ 녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹용 및 육경세포의 효율적 동결보존 기법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 보조기술 개발을 위하여 glycerol, DMSO, ethylene glycol, sucrose 등과 같은 동해보호제의 농도별 단일 혹은 병합 처리 효과 조사 - 동결보존액 내 항산화제의 처리 효과 조사 - 완만 및 급속동결 방법을 비교 분석 ○ 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 핵이식 수정란 생산기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 수정란 이식 ○ 시작품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 인공질 및 사슴용 수정란 이식기 (시작품 도면 제작) ○ 녹용 및 육경세포의 체외배양시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 배양액 (DMEM, MEM alpha, serum free medium 등)의 효과 검증 - 배양액내 혈청 첨가농도 효과 검증 - 배양기내 온도 및 산소가스 농도 효과 검증 - 배양 시 공배양세포의 효과 검증 - 다양한 성장인자의 처리효과 검증
3차년도	2012	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발 ○ 녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹용 및 육경세포를 이용한 핵이식 수정란의 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 난포란의 체외성숙기술 확립, 미세조작기를 이용한 제핵 및 핵이식 수정란 이식 기술 확립 ○ 특허출원 <ul style="list-style-type: none"> - 채란 및 이식을 위한 무선 화상전달 화이버 내시경(fiber endoscopy)시스템 제작 - 미생물(기탁) 특허출원 : 사슴 수정란 및 체외배양 녹용세포 등(2건) ○ 녹용 및 육경세포의 체외배양을 통한 생리활성물질 검색 및 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 녹용세포로부터 생산되어지는 물질의 생리활성 검증을 위하여 다양한 조직 특이 세포주를 확립 - 녹용세포의 배양중 회수되어지는 배양액내 활성물질 스크리닝 - 녹용세포의 배양중 회수된 배양액을 이용하여 조직특이세포의 성장 및 활성도 검증

2. 세부(협동)과제별 연구 내용과 범위

- **우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발(바이오컬처, 이장희)**
 - 품종별 종록의 기본 사양을 통한 녹용세포 수집 및 배양
 - 우수 종록(엘크 및 꽃사슴 각 3두)으로부터 특정 세포 추출
 - 녹용 및 육경세포의 효율적 동결보존기법 개발
 - 효율적인 보조기술 개발을 위하여 glyceropl, DMSO, ethylene glycol, sucrose 등과 같은 동결보호제의 농도별 단일 혹은 병합처리 효과 조사
 - 동결보존액내 세포외기질물질과 항산화제의 처리 효과 조사
 - Slow-, fast-freezing 방법을 비교 분석하여 효율적인 보존방법 개발
 - 녹용 및 육경세포를 이용한 핵이식 수정란의 생산
 - 난포란의 체외성숙기술 확립, 미세조작기를 이용한 제핵 및 핵주입 기술 확립
 - 미성숙 난포란의 채란기술 확립
 - 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 수정란 이식기술 확립
 - 2품종 각 5두로부터 난포란 채란 및 이식
 - 시작품 제작 : 인공질 및 범용수정란 이식기 (시작품 도면 제작)
 - 특허출원
 - 채란 및 이식을 위한 무선 화상 전달 화이버 내시경(fiber endoscopy)시스템 제작
 - 미생물(기탁) 특허출원 : 사슴 수정란 및 체외배양 녹용세포 등(2건)
 - 숫사슴의 생산을 위해서 과배란 처리 후 체내수정란 회수, 수정란 성감별 등을 적용 후 체내 수정란을 회수하여 성감별을 시행하는 기술 확립 요구

- **녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산(중앙대학교, 류범용)**
 - 사슴의 품종별 녹용세포 수집(엘크 및 꽃사슴 각 2두) 및 특성 구명
 - 녹용세포의 효율적인 분리 및 회수를 위하여 밀도차를 이용한 원심분리법과 세포외기질물질 등을 이용한 세포분리법의 적용 및 세포회수효율검증
 - 분리된 세포의 형태학적 특징과 기능적 활성화도 검증
 - 녹용 및 육경세포의 체외배양시스템 개발
 - 체외배양시스템 개발을 위하여 다양한 배양조건의 효율을 검증함
 - 배양액 (DMEM, MEM alpha, serum free medium 등),의 효과 검증
 - 배양액내 혈청 첨가농도 효과 검증
 - 배양기내 온도 및 산소가스 농도 효과 검증
 - 배양시 공배양세포의 효과 검증
 - 다양한 성장인자의 처리효과 검증
 - 녹용 및 육경세포의 체외배양을 통한 생리활성물질 검색 및 생산
 - 녹용세포로부터 생산되어지는 물질의 생리활성 검증을 위하여 다양한 조직특이세포주를 확립
 - 녹용세포의 배양중 회수되어지는 배양액내 활성물질 스크리닝
 - 녹용세포의 배양중 회수된 배양액을 이용하여 조직특이세포의 성장 및 활성화도 검증
 - 녹용세포의 배양 중 탐색되는 생리활성물질의 구체적인 활용방안 검토 요청

* 생리활성물질을 첨가한 녹용액기스 및 녹용육포 등의 건강보조식품 개발에 활용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 현황

우리나라에서 사슴사육은 1955년 대만으로부터 꽃사슴을 수입하면서 본격적으로 시작되었다. 그 후 1970년대에 미국, 캐나다, 뉴질랜드, 일본, 대만 등으로부터 레드디어, 엘크 등 1,000여두가 수입됨에 따라 사슴 사육농가와 사육두수가 증가하였다. 처음 사슴사육은 주로 관상용에서 시작되었으나 경제성장과 더불어 사슴의 주요 생산물인 녹용의 이용량이 크게 증대하게 되어 축산농가의 새로운 소득원으로 자리 잡게 되었다. 국내 사슴의 품종별 녹용생산량에 대한 비율은 꽃사슴 : 레드 : 엘크가 1 : 3 : 7로 엘크의 녹용 생산량이 가장 많고 레드디어 품종은 급격히 사라지고 있는 추세에 있다.

사슴은 발정지속시간이 매우 짧고 인적이 거의 없는 조용한 시기에 교미가 이루어지기 때문에 일반적으로 농가에서 발정이 개시되는 시기에 발정과 교미행동을 관찰할 수 있는 것은 약 2% 정도만 가능하다. 그러므로 소나 돼지처럼 자연적으로 발정이 온 사슴을 찾아 인공수정하는 것은 거의 불가능하다. 사슴의 인공수정 및 수정란이식을 위한 발정동기화(다배란) 방법에 대한 연구는 매우 많이 이루어져 다양한 방법들이 제시되고 있다. 발정주기 중에 prostaglandin F_{2a}를 투여하거나 난포자극호르몬과 황체형성호르몬을 적절하게 투여하는 방법, 질내에서 항체호르몬이 지속적으로 분비될 수 있도록 개발된 기구인 Controlled Internal Drug Release를 이용하고, 발정 및 배란촉진 효과를 증대시키기 위해 성선자극 호르몬을 병용하는 방법 등이 이용되고 있다.

중전 축산기술연구소(현 국립축산과학원)에서 1996년 꽃사슴과 레드디어로 정액을 채취하여 성상과 동결·융해 후 활력을 조사한 바 있으며, 1990년대 말(1998~2000) 사슴의 능력개발을 위해 인공수정을 희망하고 있으나 국내에는 전문가가 없고, 정액을 생산·보급하는 기관이 없기 때문에 외국의 기술자에 의해 두당 800천원~2,500천원의 고가의 시술료를 부담하면서 인공수정을 실시하였다. 그 당시 외국의 기술자의 농가 시술시 기술전수가 없어 국내의 인공수정에 대한 기술발전이 없고 외국에 지속적으로 의존해야할 실정이었으나 소나 돼지의 인공수정과 관련된 기술은 외국의 수준과 차이가 없을 정도로 기술과 시설을 갖춘 국내에서도 이와 같은 기술 수준은 보유하고 있다고 할 수 있었다.

최근 국내에서는 ‘엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향’에 관한 연구에서 충청남도 소재 12농가의 엘크사슴 32두에 대해서 인공수정을 실시하기 위한 발정유도 방법으로 CIDR를 13일 동안 질 내에 장치하고 제거 시 처리구 I은 PG600(hCG 200IU + PMSG 400IU, Intevet, Holland)를 근육주사하고 PGF_{2a} 25mg을, 처리구 II는 PG600 + FSH 200mg을, 처리구 III은 PG6000만을 투여하고 62~64시간 후에 GnRH 250mg(Fertagyl, Intevet, Holland)를 주사한 후 인공 수정한 결과 수태율은 PG600 + PGF_{2a}를 처리한 처리구 I에서 90.0%로 가장 높게 나타났으며, PG600 단독 처리한 처리구 III에서 낮게 나타났다고 보고한 바 있다(이 등. 제10차 발생공학 국제 심포지움, 2010). 또한 이 등(2010)은 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향’에 관한 연구에서 엘크 및 꽃사슴 각각 4두에 대해서 발정 및 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 엘크의 경우에는 CIDR(Pfizer New Zealand Ltd., NZ)를, 꽃사슴의 경우에는

Ring-CIDR(바이오켈쳐㈜, 한국)를 14일 동안 질 내에 장치하고, 제거 한 후 PG600(hCG 200IU + PMSG 400IU, Intevet, Holland)를 근육주사하고 PGF₂α(25mg/두) 또는 FSH (200mg/두, 24시간 간격으로 2회 주사)을 주사하여 발정 및 다배란을 유도한 다음 48시간 후에 개복 수술에 의하여 엘크 및 꽃사슴 각 2두의 난소 반응소견으로 채란된 난포란 수 및 수정란 수(채란된 난포란의 크기는 2.0mm 이상)는 각각 평균 9.0 및 8.5개 이었다고 보고하였다. CIDR 제거 후 64시간 후에 인공수정 후 7일째 엘크 및 꽃사슴 2마리씩으로부터 외과적으로 수정란을 회수한 결과 상실배 단계의 수정란은 각각 2.5 및 3.0개 이었으며, 회수된 수정란은 동 품종 각각 3마리 및 2마리에 이식한 결과 엘크 1두로부터 자록 1두를 생산하였다고 보고하면서 사슴의 다배란 처리 시 PGF₂α보다 FSH처리가 효과적인 것으로 사료되었다고 보고하였다.

복제 수정란을 생산 및 이식 기술은 인공수정기술이 정착되고, 더 나아가 수정란이식기술이 안정화 되면 시도할 수 있는 기술이다. 현재 우리나라의 경우에 수정란이식은 몇 번의 성공 경험만 있을 뿐 제대로 기술이 안정화되지 못하였다. 그러나 녹용 및 난포란(난소 포함)의 체외 배양 기술 확립 및 핵이식(체세포 복제)기술의 획기적 기술 적용에 의한 종록 개량 및 생산성 증대 기술 확립은 매우 시급하였다.

제 2 절 국외 현황

사슴에서 인공수정기술은 Jaczewski 등(1976)이 레드디어로부터 최초로 동결정액을 생산하였고, 그 이후 Asher 등(1988)등과 다른 연구자들에 의해 동결정액 인공수정으로 50~75%의 수태율을 나타내었다고 보고 된 바 있다. 사슴은 다두 및 집단사육으로 발정관찰이 어렵기 때문에 인공수정을 위해 각종 호르몬에 의해 발정을 동기화시키는 기술이 다양하게 연구되어 산업화되어 왔다. 배란과 황체호르몬(P₄)의 분비, 발정지속 시간 등의 사슴의 번식생리에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 뉴질랜드에서는 4월 중순에서 5월 초순에 꽃사슴의 첫 발정이 나타나며, 대부분의 사슴은 한 축군 내에서 발정개시 계절의 12~14일 이내에 자연적인 발정이 동기화 된다고 하였다. 북미에서는 종록 Contest에 입상한 사슴에 대하여 정액 생산용 종록으로 인정함으로써 혈통을 높이 평가하고 있으며, 우리나라에 정액판매를 목표로 종록을 개량하고 있다. 녹용세포의 배양에 관한 연구는 Li 등(2009, Curr Stem Cell Res Ther.)이 녹용에서의 핵치환 및 세포배양기술을 개발한 바 있으며, Zhong Yao Cai와 Meng HY(2009)가 녹용세포에서 생리활성인자(골다공증치료)의 분리하여 녹용세포를 의학적으로 이용한 사례가 있었다.

또한 뉴질랜드, 러시아, 캐나다, 중국 및 호주 등에서 녹용의 최대 소비국인 우리나라에 수출을 위한 전략 상품으로 건녹용, 녹용캡슐, 녹용각환, 녹용주, 녹각 공예품 등 매우 다양하게 개발되고 있으며, 뉴질랜드에서는 국가적으로 연구지원하여 레드디어 녹용세포를 복제하여 새끼를 얻는 시대를 열어가고 있는 기술 수준이며(Berg 등, 2007), 각 국(뉴질랜드, 호주, 캐나다, 미국 등)의 가장 큰 수출시장은 한국으로 우리나라 사슴산업(녹용 소비량의 80% 수입 의존)을 심각하게 위협하고 있는 실정이다. 녹용 소비가 집중되어 있는 시장 특성상 외국의 수입량에 의존할 수 밖에 없으며 가격 경쟁에서도 국내 농가와의 격차가 점점 심해지는 추세이다(한국양록협회).

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 우수 종록의 확보 및 녹용 세포 수집

1. 종록의 확보 및 사양관리

핵이식 수정란을 생산하기 위한 공여세포 종록(수사슴)으로 엘크는 2010년도 한국양록협회에서 선정한 우수 사슴을 보유한 농가로부터 구입하였으며, 꽃사슴은 서울숲공원에서 구입하였다(그림 1). 1차년도 난자 및 수정란 생산용 암사슴으로는 엘크 20, 꽃사슴 12두를 공시하였으며(운봉산 사슴농장), 인공수정 및 수정란이식 기술 확립을 위해서 인근 6개 농장의 엘크 64두에 대해서 발정동기화(다배란처리 포함) 및 인공수정을 실시하였다.



(좌: 엘크 - 한국양록협회 2010년 우수 사슴, 녹용생산량: 20.95kg)

(우: 꽃사슴 - 서울 숲공원으로부터 구입, 녹용생산량: 2.3kg)

그림 1. 공시 종록

2차년도에는 운봉산 사슴농장에서 사육되고 있는 엘크(수컷 4, 암컷 20) 및 꽃사슴(수컷 4, 암컷 12)을 암수 구분하여 관리하되 1일 두당 각각 4~6kg 및 1~2kg의 TMR 사료를 급여하고, 건초(농업부산물인 볏짚 등)는 다음날 사료조에 남아 있지 않을 정도로 하여 자유 급식시켰다. 대개 시험 처리 전 24시간 이전부터 절식하여 처치하였으며, 시험축의 일반적인 사양관리는 운봉산사슴농장(충남 천안시 목천읍 서흥리 131번지 소재)의 관행에 따라 관리하였다(협력농장 전경. 그림 2.)



그림 2. 협력농장 전경(2011년)

3차 년도에는 엘크(2차년도 사고 발생에 따라 매우 위험한 관계로 생략)를 제외하고 꽃사슴 22두에 대해서 핵이식 수정란 생산과 이식에 전담하였다.

2. 핵이식 수정란 생산을 위한 공여핵 세포 확보

핵이식 수정란을 생산하기 위한 공여핵 세포를 확보하기 위하여 1차 년도에 확보된 우수 사슴인 엘크로부터 체세포(녹용 및 귀세포)를 채취하였으며(그림 3), 꽃사슴의 경우에는 부천 어린이 동물원으로부터 추가 구입한 꽃사슴 3두로부터 귀세포 및 녹용(피부, RM=mesenchyme 및 bone)을 각각 수집하였다(그림 4). 귀세포를 채취할 경우에는 베타딘으로 소독하고 제모한 후 70% 알콜솜으로 3~4회 추가 소독한 후 메스 또는 편치로 약 직경 5.0mm 정도의 넓이로 채취하여 생리식염수 용액에 담아 실험실까지 운반하였다. 녹용세포의 특성을 조사하고 핵이식 수정란 생산을 위한 공여 세포의 확보를 위하여 협동연구기관(중앙대학교)과 공동으로 녹용 생산이 우수한 사슴으로부터 공여 세포를 채취하였다. 녹용의 채취는 낙각 후 3일 이내인 육경, 30일 및 60일경 녹용 및 최종 상품 생산시의 녹용(낙각 후 75~85일 경)를 절각하여 각각 세포를 부위별로 채취하였다.



(한국양록협회 2010년 우수 사슴, 2011년 용생산량: 19.05kg)

그림 3. 공시 종록(엘크) 및 녹용(공여 핵 체세포)



그림 4. 핵이식용 귀 및 녹용(체세포)세포 채취

녹용 세포 및 정액 채취 등 사슴의 마취는 대개 하루 전부터 절식하고 엘크의 경우 Fentazin-10(동방주식회사, 한국)을 체중 100kg당 0.5ml를 주사하였다. 꽃시슴은 KetamineHCl(Ketaset, USA) 2mg/kg(BW) 및 Xylazine.HCl (Rompun, USA) 0.25mg/kg(Body Weight)을 주사기에 장전하여 Blow gun으로 근육 주사하여 전신 마취하였다. 마취 후 회복제로 콘트란-H를 마취제 투여량의 1.5배의 량을 정맥 주사하였다.

3. 정액 채취 및 동결정액 제조

정액채취는 마취후 외부생식기를 세척, 소독하고 음경을 외부로 돌출시켜 가제로 살며시 감싸권 후 전기자극정액채취기(그림 5)를 직장 내에 삽입하고 천주 부위를 3-5초간 통전, 3-5초간 절전으로 수회 반복 자극하여 정액을 채취하였다(그림 6).



그림 5. 전기자극정액 채취기

전기자극정액채취법은 다음과 같았다.

- (1) 사용하기 전에 전기자극정액채취기를 약 6~12시간 충전시킨다(220V)
 - 본체의 전원연결단자에 코드를 꽂고 충전시에는 전압용 조절레버를 충전램프 위치로 돌린다.
- (2) 사용시에는 본체의 probe 연결 코드에 probe를 연결한다.
 - 이때 손잡이에 부착된 스위치를 눌러 전원램프가 켜지는 것을 확인한다.

(3) 정액을 채취하고자 하는 대상 동물(개, 원숭이 등)의 직장 내에 probe를 삽입시킨다. - 이때 probe 선단에 윤활제(lubricant)을 묻힌 후 보정된 동물의 직장 내에 서서히 삽입시키되 probe의 선단 부위가 천추(양쪽 골반의 중앙 하단부) 밑에 위치하도록 한다. (Probe를 15° 상방향으로 위치시키며, 꼬리와 함께 probe의 손잡이를 잡는다)

(4) Probe의 스위치를 누른 후 본체의 전압조절레버를 서서히 오른쪽으로 돌려 대상 동물의 반응을 살핀다 (작은 전압으로 시작하여 갑작스런 놀람을 방지한다).

- 대상 동물이 반응을 보이면 레버를 ZERO위치로 역회전하여 전원을 끄며(자극을 멈춤), 2~3회 반복 실시하여 자극에 순응하도록 한다(이때 보정을 확실하게 한다). 자극에 대한 순치 후 다시 자극을 서서히 가하여 대상동물이 뒷다리를 쭉 뻗을 정도로 자극의 크기를 높혀 3~5초간 통전한(복압과 사정중추의 반응을 일으킴) 후 순간적으로 절전한다(zero로 위치시킴). 이를 3~6회 반복 실시하면 복압과 사정중추를 자극하게 되므로 통상 사정하게 되는 바, 자극을 줄 때(통전)보다 통전 직 후 절전시키면 사정하게 된다.



그림 6. 전기자극채취법에 의한 사슴 정액 채취

상기와 같이 채취된 정액은 이 등(2003)이 개발한 방법으로 동결보존시켰다. 본 연구에 사용된 동결보존액은 기본적으로 이 등(1996)이 개발한 희석액을 1차 희석액으로 사용하였으며, 성분은 20% 난황, 1.6% Glucose(Sigma, USA), 1.6% Fructose(Sigma, USA), 1.2% Tes-N-tris(Sigma, USA), Penicillin 1,000IU/ml(Sigma, USA), Stretomycine sulfate(Sigma, USA) 1mg/ml, 0.5% Orvus Es Paste(NOVA chemical sales, USA)가 함유되었다. 2차 희석액은 1차 희석액에 16% glycerol, 1.8M ethylene glycol(Sigma, usa) 또는 0.5% polyethylene glycol(Sigma, usa)이 함유되도록 하여 동해방지제의 종류가 동결융해 후 사슴 정액에 미치는 영향을 조사하였으며, 동결융해 후 생존성과 활력을 개선하기 위하여 2차 희석액에 BSA(0.1%, Sigma, USA), herparin(10 μ g/ml, Sigma, USA)과 녹용엑기스 및 수사슴 혈청을 각각 0.1, 0.5 및 1.0% 의 첨가수준별로 첨가하여 동결 융해 후 활력을 조사하였다. 2차 희석액에 첨가되는 혈청은 절각 시기의 수사슴 경정맥으로부터 채혈하여 4℃의 냉장고에 12시간 이상 보관하였다가 혈청을 1500rpm으로 20분간 원심분리하여 -20℃의 냉동고에 보관하였으며, 정액에 첨가하기 전에 56℃ 항온수조에서 30분간 비동화시켜 사용하였다. 녹용추출액은 절각된 생녹용을 -80℃의 냉동건조기(Freezer dryer, 일신랩, 한국)에서 1주일 이상 건조시켜 추출된 농축액을 혈청과 같은 방법으로 보관하였으며, 정액 첨가 시에는 비동화시켜 사용하였다.

동결처리방법은 Monfort 등(1993)의 방법에 준하되 채취 직후 상온(20℃~25℃)에서 1차 희석액으로 정액과 1:1로 희석한 후 정액성상 검사를 실시하고 정자농도가 2.4 \times 10⁸sperm/ml 되게 추가 희석한 다음 5℃까지 1~2시간에 걸쳐 냉각하였다. 냉각된 정액은 동해보호제가 포함된 2차 희석액(5℃)으로 최종 1차 희석된 정액과 1:1로 서서히 희석하였다. 최종 2차 희석된 정액

을 0.25ml 또는 0.5ml straw 에 분주, 봉입한 다음 \varnothing 2cm, 30cm 길이의 수직파이프(또는 rack)에 정치시켜 액체질소 내에서 10분간 예비동결 후 액체질소에 침적시켜 동결하였다. 정액 검사는 정자농도, 활력 및 생존율 등의 일반검사를 실시하였다. 정상두모율은 Pursel 등 (1975)의 방법으로 조사하였고 침체반응율은 Didion 등(1989)의 방법에 따라 2중 염색법으로 실시하였다.

4. 결과

가. 번식 및 비번식계절에 있어서 정액 성상의 변화

엘크 및 꽃사슴 각각 3두에 대하여 번식계절(9~1월)과 비번식계절(2~8월)에 전기자극법으로 정액을 채취하여 정액성상을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 번식 및 비번식계절이 사슴의 정액 성상에 미치는 영향

품 종	채취두수	정액성상					
		번식계절(9~1월)			비번식계절(2~8월)		
		정액량 (ml)	정자농도 ($\times 10^8$ sperm/ml)	활력 (%)	정액량 (ml)	정자농도 ($\times 10^8$ sperm/ml)	활력 (%)
엘크	3	7.24	24.6	88.3	0.43	8.6	61.7
꽃사슴	3	1.50	18.2	72.5	0.33	6.5	25.8

표 1에서 나타난 바와 같이 엘크 및 꽃사슴에 있어서 번식계절의 정액량은 각각 7.24 및 1.50ml로 엘크가 꽃사슴 품종보다 정액량이 많았으며, 비번식계절의 정액량은 각각 0.43 및 0.33ml로 두 품종 간에 차이가 없었다. 번식계절에 채취된 꽃사슴의 정액량은 Trothan 등 (1994)은 farrow deer에서 전기자극방법으로 번식계절에 0.5~1.5ml의 정액을 채취하였다고 한 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 엘크의 경우 번식계절의 정액량이 다른 품종에 비하여 많이 나타난 것은 정액 전구물질이 많았거나 오줌이 다소 혼입된 것으로 사료되었다. 한편 품종별 정액량에 대해서 많은 차이가 나타난 것은 전기자극법에 의한 정액채취방법이 채취시마다 번이가 심하여 더욱 개선되어야 할 것으로 사료되었다.

번식 및 비번식계절에 따른 정자농도는 엘크 및 꽃사슴이 각각 24.6 및 18.2×10^8 sperm/ml와 8.6 및 6.5×10^8 sperm/ml로 번식계절의 정자농도가 비번식계절보다 높게 나타났다. 정액 활력은 엘크 및 꽃사슴이 번식계절에서 72.5~88.3%로 비번식계절의 25.8~65.0% 보다 양호한 성적을 나타냈다.

나. 정액의 동결과정 중 정자 활력의 변화

사슴정액을 mBF5F보존액으로 0.25ml 및 0.5ml 스트로에 주입하여 동결하였을 때에 동결과정 중 정자활력 변화를 조사한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 개체별 및 포장용기에 따른 동결과정 중 정자 활력의 변화

품 종	공시 두수	채 취 회 수	활 력 (%)					
			채취시	Glycerol 평형 후	예비동결 후		용해 후	
					0.25ml straw	0.5ml straw	0.25ml straw	0.5ml straw
엘 크	3	8	92.5	85.5	80.0	77.3	67.5	65.0
꽃 사슴	2	6	85.0	80.0	75.5	75.0	66.3	60.0

정액 채취 직후의 활력은 92.5~85.5%이었으나 glycerol 평형 후에는 85.5~80.0%이었다. 예비동결 시 활력은 0.25ml 스트로에서는 80.0~75.5%, 0.5ml 스트로에서는 77.3~75.0%였고, 동결·용해 후 정자활력은 0.25ml 스트로에서는 67.5~66.3%, 0.5ml 스트로에서는 65.0~60.0%로 개체에 따라 차이는 있지만 0.25ml 스트로에 정액을 주입하여 동결하였을 때가 0.5ml 스트로보다 다소 활력이 좋은 것으로 나타났다.

다. 생리활성물질의 첨가 종류 및 수준이 동결된 정액의 용해 후 정액 성상에 미치는 영향

사슴 정액의 동결보존액을 개발하기 위하여 m-BF5F 보존액에 2차 희석시 생리활성물질을 첨가하여 동결용해한 엘크사슴 정자의 활력과 정상 두모율을 조사한 결과는 표 3과 같다. BSA가 첨가되었을 때의 활력 및 정상 두모율은 68.3% 및 48.3%, heparin 첨가시에는 63.5% 및 60.8%, BSA와 heparin을 함께 첨가시는 69.4% 및 59.8%, 혈청을 첨가시는 70.0% 및 57.5%, 녹용추출액 첨가시는 67.5% 및 58.4%로 m-BF5F 보존액에 생리활성물질을 첨가하지 않은 대조구의 56.2% 및 52.5%보다 생리활성물질을 첨가하였을 때가 활력과 정상 두모율이 대체로 양호하였다.

표 3. 생리활성물질의 첨가 종류가 정액의 동결용해 후 성상에 미치는 영향

보 존 액	동결용해 후 성상 (%)	
	활 력	정상두모율
mBF5F ¹⁾	56.2	52.5
mBF5F + BSA ²⁾	68.3	48.3
mBF5F + Serum ⁴⁾	70.0	57.5
mBF5F + 녹용추출액 ⁵⁾	67.5	58.4

¹⁾대조구

²⁾Bovine serum albumin을 0.1% 수준이 되게 첨가

³⁾혈청(Serum)을 0.5% 수준이 되게 첨가

⁴⁾녹용추출액이 0.5% 수준이 되게 첨가

첨가한 생리활성물질 중에 정자의 활력은 혈청 첨가가 다른 물질보다 양호한 성적을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어보아 사슴 정액의 동결융해 후의 활력을 개선하기 위해서는 녹혈에서 회수한 혈청 첨가가 다소 유리하였다.

동결정액의 융해 후 생존성을 개선하기 위하여 m-BF5F 보존액에 생리활성물질인 녹용추출액 및 수사슴 혈청을 각각 1.0% 수준으로 첨가하여 동결융해 후 활력을 조사한 결과는 표 4와 같다. 엘크와 꽃사슴에서 모두 수사슴의 혈청 첨가가 녹용추출액 첨가보다 다소 활력이 높게 나타났다. 사슴 동결정액 제조 시 생리활성물질의 첨가는 대조구보다 동결융해 후의 활력을 3~8% 수준 높였다.

표 4. 생리활성물질의 첨가 수준이 동결융해 후 정자의 생존성에 미치는 영향

구 분	품종별 동결융해 후 활력(%)	
	엘 크	꽃사슴
대 조 구(mBF5F액)	63.5	47.3
녹용추출액 1.0% 첨가	70.3	50.3
혈청 1.0% 첨가	72.0	62.0

라. 동해보호제가 동결·융해 후 정자의 생존성에 미치는 영향

동해보호제의 종류가 동결융해 후 정자의 활력에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 5와 같다. 번식계절(9~1월)에 전기자극법으로 엘크 및 꽃사슴의 정액을 채취하여 동해보호제로 glycerol, ethylene glycol 및 polyethylene glycol를 사용하였을 때 동결융해 후 정자의 활력은 3품종 사슴 모두 glycerol이 다른 동해보호제보다 다소 높은 활력을 나타내었다.

표 5. 동해보호제가 동결 융해 후 사슴 품종별 정자의 생존성에 미치는 영향

품 종	채 취 두 수	채취시 활력(%)	동결융해 후 활력(%)		
			Glycerol ¹⁾	Ethylene glycol ²⁾	Polyethylene glycol ³⁾
엘 크	3	85.3	62.5	59.7	25.5
꽃 사 슴	3	78.5	52.3	50.3	22.8

¹⁾1차 희석액에 glycerol 16.0% 함유

²⁾1차 희석액에 ethylene glycol 1.8M 함유

³⁾1차 희석액에 polyethylene glycol 0.5% 함유

동해보호제로 이용되는 침투성 동해보호제(glycerol 및 ethylene glycol)가 비침투성 동해보호제(polyethylene glycol)보다 다소 좋은 성적을 나타내었다. 엘크사슴에서는 채취시 정자활력이 85.3%에서 동결융해 후 62.5%로 내동성이 다소 좋은 것으로 나타났다. 그러나 glycerol 첨가 수준과 침투성 및 비침투성 동해보호제의 혼합 첨가가 생존성에 미치는 영향에 관해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

제 2 절 녹용 세포의 배양 기법 확립과 동결 보존

1. 녹용 및 육경 세포의 대량 생산을 위한 체외 배양 시스템 개발

가. 우수 종족으로부터 특정 조직 세포 확보

핵이식 수정란(Nuclear Transferred Embryo) 생산 기법의 공여세포 확보를 위하여 녹용생산이 우수한 엘크 사슴의 귀에서 세포조직을 채취하였다. 먼저 마취된 엘크 사슴으로부터 한쪽 귀의 가장자리를 제모하고 소독하여 멸균 소독된 수술 도구로 1 cm x 1 cm의 삼각형으로 절개해낸 다음 phosphate buffered saline (PBS)에 담아 1시간 이내에 실험실로 옮겼으며, 녹용의 경우에는 세척 소독 후 절각하여 실험실로 옮겨 처리하였다. 녹용 또는 귀 조직은 다시 PBS로 2-3회 세척한 후 세척하고 뭉개어 부유액과 덩어리를 버린 후 침전된 아주 작은 조직(세포괴)을 대상으로 세포 회수를 위한 최적의 조건을 확립하고자 복합효소(CollagenaseIV, Hyaluronidase, Trypsin) 처리의 효율성을 검증하였다.

복합효소처리를 위하여 CollagenaseIV 2.5 mg/mL (90분 처리), hyaluronidase 1 mg/mL (20분 처리), 0.25% trypsin (10분 처리)효소의 처리 농도 및 시간 등의 검증을 통하여 다음과 같은 순차적인 효소처리를 통하여 최적의 세포회수율을 얻을 수 있었다. 회수된 세포의 안정적 확보를 위해 체외배양조건으로 일반적으로 동물 세포의 배양에 사용되는 DMEM-S (Dulbecco Modified Eagle Medium with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM b-mercaptoethanol, 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin) 배양액에 FBS 10%(v/v)를 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 귀 조직으로부터 회수된 세포를 상기 배양조건으로 배양한 결과 doubling time은 1.5일(생존율 95%)이었고 약 3주간의 배양을 통하여 최초 회수된 세포 수 대비 약 2,500배 이상의 세포를 확보하였다.

나. 특정 세포의 분리 및 회수

(1) 녹용 세포의 분리

초기 녹용의 성장 3-4개월 후 사슴으로부터 외과적 수술을 통하여 살균적으로 녹용을 채취하였고 아래 그림 7과 같이 녹용 조직을 부위별로 구분하여 세포를 회수하였다.

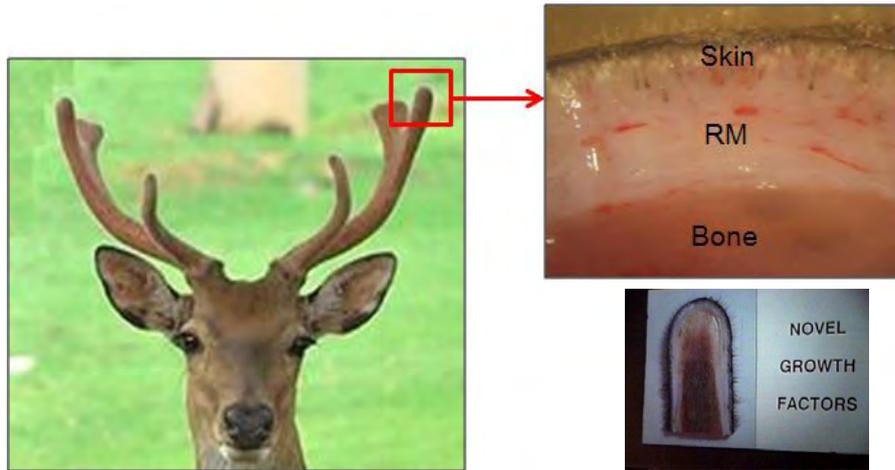


그림 7. 녹용의 부위별 조직 구분. skin, RM(reserve mesenchyme), bone.

(2) 녹용의 부위별 세포 분리 방법 확립

녹용 세포의 각 부위별 효율적인 회수를 위한 효소(collagenase IV, hyaluronidase, trypsin)의 농도 및 처리시간 효율을 검증하였다. Skin 부위는 상기 귀 조직의 세포 회수법과 동일한 방법을 적용하여 최적의 회수율을 얻을 수 있었고, RM 부위의 collagenase IV 농도별 처리효과를 검증한 결과 저농도(1-2 mg/mL) 처리에서는 세포분리를 위하여 4-5시간이 소요되었으며, 이에 따라 회수된 세포의 생존율이 80% 내외로 저하되었으며, 2.5 mg/mL로 처리농도를 높여 조직으로부터 세포의 분리시간을 2시간 이내로 단축할 수 있었고, 1 mg/mL의 hyaluronidase와 0.125%의 trypsin용액의 순차적인 복합 처리를 통해서도 세포회수율을 증진시킬 수 있었을 뿐만 아니라 세포의 생존율도 94%로 증진시킬 수 있었다. Bone 부위는 RM 부위의 회수시 효율적이었던 순차적인 복합효소처리(2.5 mg/mL collagenase IV, 1 mg/mL hyaluronidase, 0.125% trypsin 용액 처리)를 기준으로 세포를 회수한 결과는 다음과 같았다. 0.125% trypsin 처리 단계에서 세포분리가 원활하지 않았고 처리시간이 길어짐에 따라 회수되는 세포의 생존율이 80% 내외로 저하되었다. 이에 따라 처리 농도를 0.25% trypsin으로 2배 증가시켜 세포분리 효율을 증진되었고 회수된 세포의 생존율도 90% 정도로 증진되었다. 이러한 복합효소처리법을 이용하여 녹용(Skin, RM, Bone)의 부위별에 따른 효율적인 세포 분리법을 확립하였다.

(3) 밀도차를 이용한 원심 분리법과 세포외 기질물질을 이용한 녹용 세포의 회수기법 확립

① Percoll의 밀도차(Percoll gradient)와 원심 분리를 이용한 녹용 세포의 회수

- 여러 농도(10-60%)의 Percoll 용액을 순차적으로 주입한 상층액에 회수된 녹용 세포를 위치시켜 10분 동안 원심 분리(600 x g)를 실시한 결과 30% 단일층을 사용하였을 때 적용이 간편하면서 효율적인 세포 회수율을 얻을 수 있었다.
- Percoll (30%) 단일층을 이용한 원심 분리를 통하여 아래 그림 8과 같이 녹용 조직으로부터 세포의 분리시 혼입되었던 세포 찌꺼기(cell debris)와 적혈구 등의 혼입물을 깨끗

이 제거할 수 있었다.

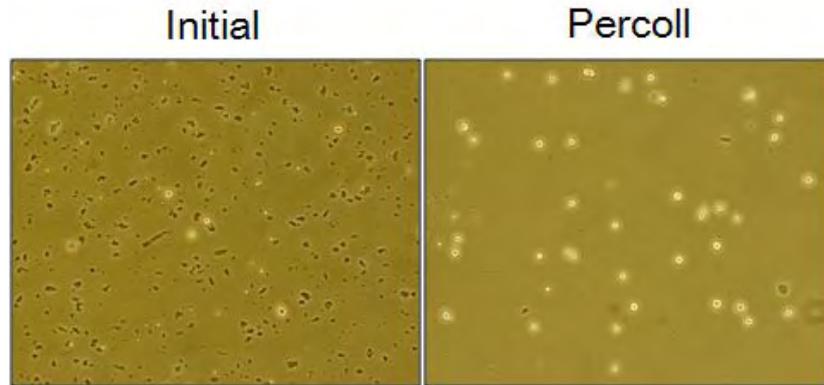


그림 8. Percoll의 밀도차를 이용한 녹용 세포의 회수

* Initial : 복합효소처리를 통하여 회수된 녹용 세포.

* Percoll : Percoll (30%) 단일층을 이용한 원심 분리를 통하여 회수된 녹용 세포(initial 세포군에서 혼입되었던 세포 찌꺼기와 적혈구 등의 혼입물이 깨끗이 제거된 세포군이 회수됨).

② 세포의 기질물질(ECM; extracellular matrix)을 이용한 녹용 세포의 분리 효율 검증

- 녹용 세포의 특성 분석과 세포의 기질물질에 대한 친화성을 확인하기 위하여 다양한 종류의 세포외기질물질을 이용한 세포 분리를 실시하였다.
- 세포외 기질물질로서 collagen, fibronectin, laminin과 gelatin이 피복된 배양 접시를 이용하여 녹용 세포의 회수 정도를 분석하였다(control: 일반 세포 배양 접시, polystyrene 피복).
- 각각의 세포외 기질물질이 피복된 배양 접시에 회수된 녹용 세포를 주입하고 40분간 배양한 후 배양 접시 바닥에 부착된 세포(Adherent)와 부착되지 않고 배양액에 부유되어 있는 세포(Non-adherent)를 회수하여 개수하는 방법으로 효율을 검증하였다.
- 각각의 처리를 통하여 배양 접시 바닥에 부착되지 않고 부유되어 있던 세포와 바닥에 부착되었던 세포의 비율은 다음과 같았다. Control(73.2, 26.8%), collagen(35.7, 64.3%), fibronectin(7.1, 92.9%), laminin(74.0, 26.1%), gelatin(63.9, 36.1%) (그림 9).

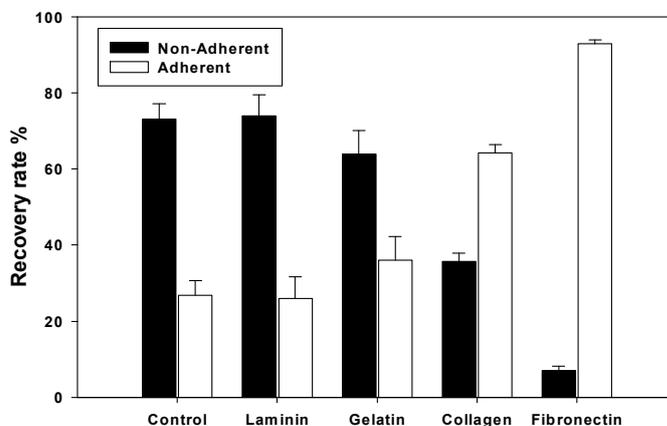


그림 9. 세포의 기질물질을 이용한 녹용 세포의 회수

- 세포의 기질물질의 처리 중 녹용 세포의 친화성이 fibronectin의 처리에서 가장 높게 나타남에 따라 추후 녹용 세포의 특성 분석 및 순수 분리에 fibronectin을 이용한 방법이 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

다. 분리된 녹용 세포의 형태학적 특징과 세포 배양을 통한 활성화 검증

실체 현미경을 이용하여 회수된 녹용 세포의 부위별 형태학적 특징 관찰하고(그림 10), 부위별로 분리된 녹용 세포는 체외배양을 통하여 각각의 활성도를 조사하였다. 기초배양액으로서 선행연구를 통하여 다양한 체세포배양에 효율적이었던 DMEM-S(FBS 10%)를 이용하였다.

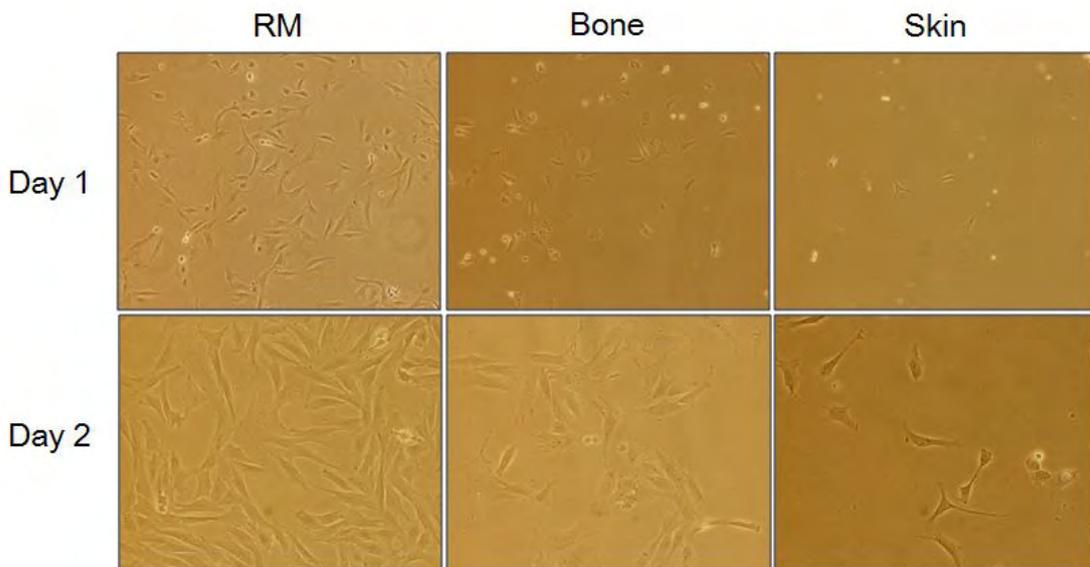


그림 10. 녹용의 부위별로 회수된 세포들의 형태학적 특징 및 체외배양 양상

녹용의 부위별로 회수된 세포들의 형태학적 특징은 다음과 같았다.

(1) RM 세포

- 배양시작 후 12시간 내에 배양접시 바닥에 부착되어 증식됨이 관찰되었고, 배양 2일 후에 세포수가 2.8배 증가되었다.
- day 0; 1.0×10^6 , day 1; 1.7×10^6 , day 2; 2.8×10^6

(2) Bone 세포

- 배양시작 후 1일이 경과되었을 때 대부분의 세포들이 배양 접시 바닥에 부착되었으며, 배양 2일 후에 세포수가 1.7배 증가되었다.
- day 0; 1.0×10^6 , day 1; 1.3×10^6 , day 2; 1.7×10^6

(3) Skin 세포

- 배양시작 후 대부분의 세포들이 배양 접시 바닥에 부착되는데 2일 정도가 소요되었으며, 이후 세포 증식이 이루어지는 지는 것으로 관찰되었다.
- day 0; 1.0×10^6 , day 2; 1.1×10^6

상기결과를 통하여 녹용의 부위별로 회수된 세포들에서 형태적인 차이와 함께 체외 배양을 통한 활성화도 정도에서 차이가 나타남을 확인하였다.

2. 녹용 세포의 기본 체외 배양 조건 검증

가. 배양액 및 혈청의 종류가 녹용 세포의 체외 배양에 미치는 효과 검증

녹용 세포의 효율적인 체외배양시스템 개발을 위한 기초 연구로서 기본 배양 조건에 따른 증식 양상을 검증하였다.

(1) 세포 배양액의 처리 효과

- DMEM-S(FBS 10% 첨가)와 중간엽 줄기세포의 배양용으로 개발된 mesenchyme 배양액(MSC medium, FBS 첨가되지 않음)의 효과를 검증하였다.
- 2일간의 배양을 통하여 DMEM-S와 MSC 처리군에서 각각 세포수가 2.8배, 3.7배 증가된 결과로서, MSC 처리에서 세포 증식 정도가 높게 관찰되었다(그림 11).

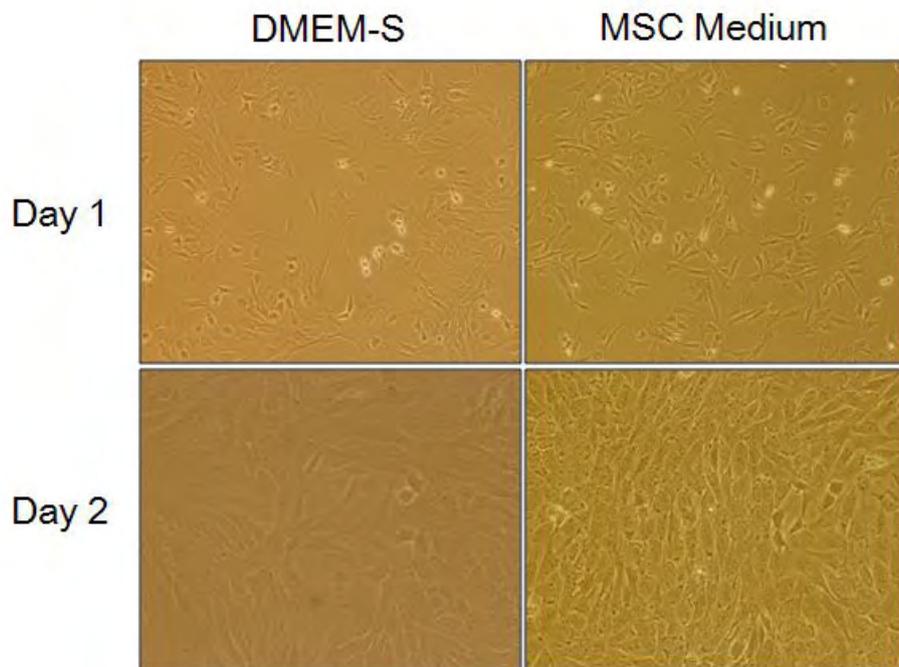


그림 11. 배양액에 따른 녹용 세포의 체외 배양 양상

(2) 혈청의 종류에 따른 배양 효과

- 동종인 사슴 혈청(deer serum)의 첨가 효과를 검증하기 위하여 DMEM-S 배양액에 FBS와 deer serum을 각각 10% 첨가하여 녹용 세포의 체외배양 양상을 조사하였다.
- 2일간의 배양을 통하여 FBS와 deer serum처리군에서 각각 세포수가 2.8배, 3.3배 증가된 결과로서 deer serum처리에서 세포 증식 정도가 높게 관찰되었다(그림 12).

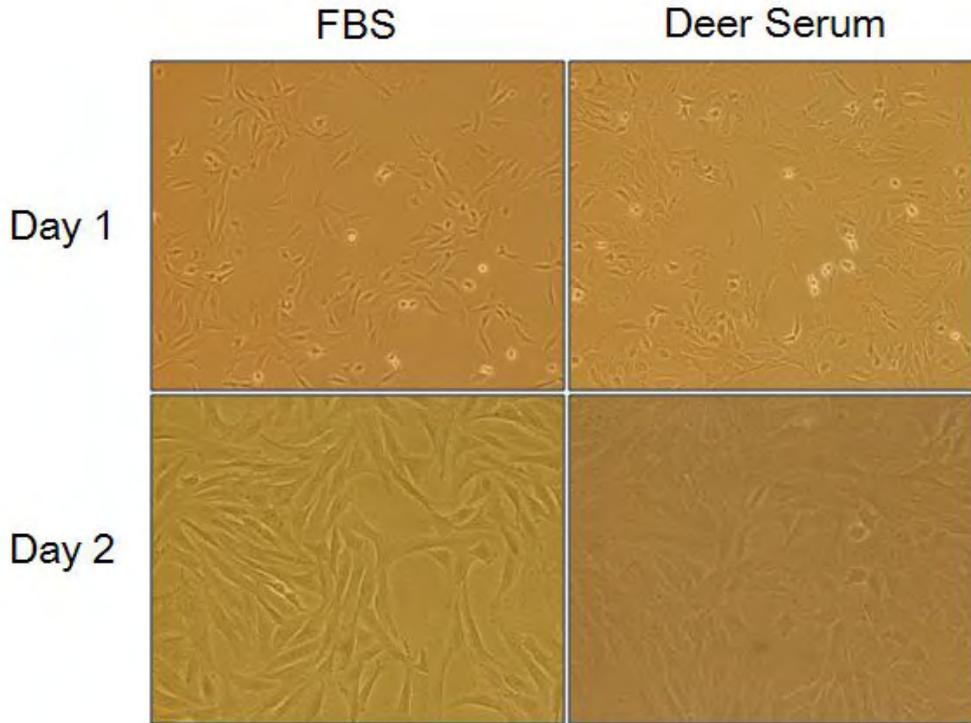


그림 12. 배양액내 첨가되는 혈청의 종류에 따른 녹용 세포의 체외 배양 양상

상기 결과를 토대로 2차년도에 수행예정인 녹용 세포의 효율적인 체외 배양 시스템 개발을 위한 기반 조건을 확립하였다.

나. 녹용 세포의 체외배양 조건 검증

녹용 세포의 효율적인 체외 배양 시스템을 개발하기 위하여 적합한 배양액의 선별, 배양기 내 적정 온도와 산소 농도의 검증 및 배양액 내 첨가물과 성장 인자들이 세포 증식에 미치는 영향을 분석하여 녹용 세포의 체외 증식을 위한 최적을 조건을 구명하였다.

(1) 배양액에 따른 세포 증식 효율 분석

1차년도에 확립된 녹용 세포의 분리 기술을 이용하여 녹용 세포의 RM(Reverse mesenchyme) 부위를 회수하고 각각의 배양액 BGJb medium (BGJb), DMEM, DMEM: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), Iscove' Modified Dulbecco' Medium (IMDM), Minimum Essential Medium alpha (MEMα), MesenCult™ Basal Media supplemented with MSC stimulatory supplements (MSC), RPMI-1640 medium (RPMI), StemPro-34® SFM (StemPro)에 기본 첨가물로서 10% 우태아혈청 (FBS)와 0.5% p/s (penicillin/streptomycin)을 첨가하고 37°C, 20% O₂, 5% CO₂ 조건에서 세포를 1주간 배양하였다. 배양 과정 중 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 각각의 배양 조건에서 1주간 배양 후 세포를 회수하여 계수하였다. 각각의 처리에 따른 세포 증식 효율은 최초 배양을 시작했던 세포 수 대비 1주간 배양 과정을 통하여 증식된 세포의 비율을 산정하여 분석하였다.

- 다양한 세포 배양액들 중 그간 동물 세포 배양에 유용성이 있다고 보고된 배양액을 선택

하여 녹용 세포의 체외 배양 효율을 검증해본 결과, 1주간 배양 후 녹용 세포의 증식 정도는 각각의 처리에서 BGJb, DMEM, DMEM/F12, IMDM, MEMa, MSC, RPMI와 StemPro 각각에서 2.5 ± 0.1 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 4.3 ± 0.3 , 3.4 ± 0.0 , 3.5 ± 0.3 , 5.8 ± 0.3 , 10.1 ± 0.3 , 3.3 ± 0.1 , 2.7 ± 0.3 fold 증가된 결과를 보였으며, MSC 처리에서 다른 모든 처리군들과 비교했을 때 유의적으로 가장 높은 증식율을 나타내었다(p < 0.05) (그림 13). MEMa 처리를 통한 세포의 증식율은 MSC 처리와 비교하여 유의적으로 낮은 결과를 보였으나 이외 다른 모든 처리군들과 비교하였을 때 유의적으로 높은 결과를 보였다(p < 0.05) (그림 13). 녹용 세포의 생존율은 92.3 ~ 99.7%로 배양액 처리군간 큰 차이를 보이지 않았다.

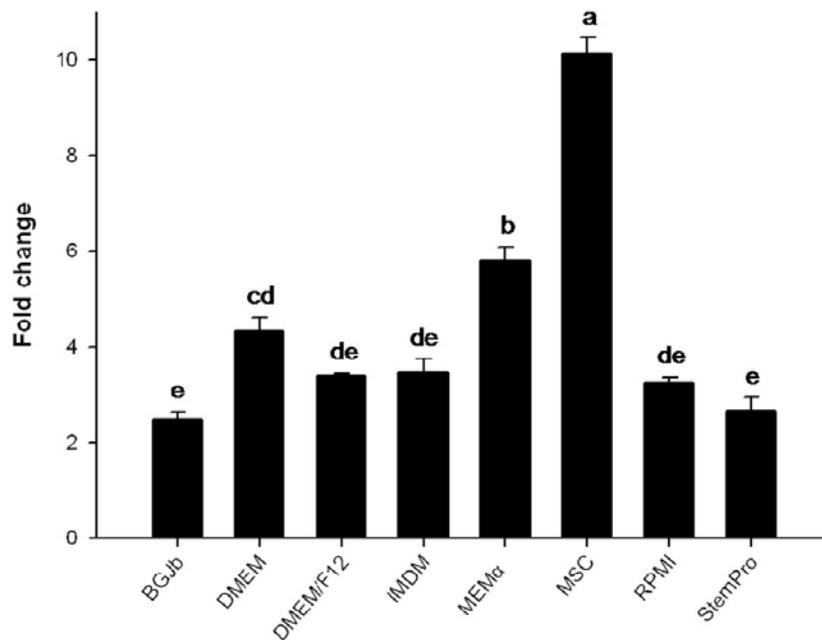


그림 13. 배양액의 종류에 따른 녹용 세포의 증식률.

녹용 세포의 증식율이 가장 높게 나타난 MSC 배양액의 경우, 특정 조직 세포의 배양을 타겟으로 상용화된 배양액으로서 배양액의 조성이 알려져 있지 않기 때문에 배양시 영향을 미치는 인자 분석 등을 위해서는 부적절한 측면을 지니고 있다. MSC를 제외한 나머지 배양액 간에 녹용 세포의 증식 효율을 분석한 결과 MEMa 배양액에서 다른 배양액과 비교하여 유의하게 높은 결과가 나타났다.

한편 다양한 배양액의 효과를 검증한 결과 가장 효율이 높았던 MSC 배양액을 이용한 녹용 세포의 배양기간별 증식률을 검증한 결과 누적 증식률은 첫 번째 1주차, 2주차, 3주차 각각에서 8.6배, 79.7배, 741.9배의 세포 증식률을 나타내었다.(그림 14). 세포증식률(fold change)은 각각의 처리군에서 증식된 세포 수를 최초 배양을 시작했던 세포 수로 나눈 값으로 하였다.

따라서 상기의 결과를 토대로 조성 성분이 모두 알려지고 녹용 세포의 증식에 효과적이었던 MEMa 배양액을 기본 배양액으로 선별하여 배양액내 혈청 첨가 효과 및 배양기 내 온도, 산소가스 농도에 따른 녹용세포의 배양 효율을 조사하였다. 이후 각각의 처리에 따른 녹용 세포의 증식 효율은 최초 배양을 시작했던 세포 수 대비 1주간의 배양 과정을 통하여 증식된 세포의 비율을 산정하여 분석하였다.

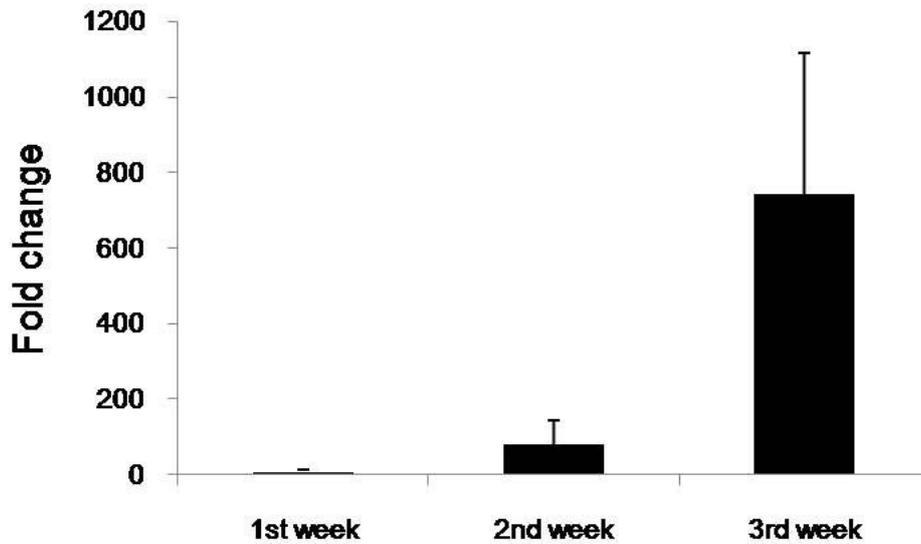


그림 14. MSC 배양액에 따른 녹용 세포의 배양기간별 증식률

* 세포증식률(fold change) = 각각의 처리군에서 증식된 세포 수 / 최초 배양을 시작했던 세포 수

다. 배양액 내 혈청 첨가 수준의 효과 검증

녹용 세포의 배양시 배양액 내 혈청 첨가 효과를 알아보기 위하여 동물 세포 배양에 보편적으로 사용되고 있는 FBS와 동종의 혈청인 deer serum을 대상으로 첨가 농도에 따른 효과를 조사하였다. 배양액 내 혈청 첨가에 따른 녹용 세포의 증식 정도를 분석하였다.

(1) FBS의 처리 효과

- 1주간의 배양을 통하여 FBS의 첨가 농도에 따른 증식 효율은 0, 5, 10, 20% 처리군에서 각각 1.1 ± 0.1 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 2.2 ± 0.2 , 6.5 ± 0.7 , 7.5 ± 0.5 fold 증진된 결과로서 첨가 농도가 증가할수록 증식 효율이 증진되는 경향을 보였다(그림 14).

(2) 사슴혈청(Deer serum)의 처리 효과

- Deer serum 처리의 경우 첨가 농도에 따라 5, 10, 20% 처리군 각각에서 녹용 세포의 증식율은 2.0 ± 0.4 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 2.9 ± 0.3 , 5.3 ± 0.4 fold 증진된 결과로서 FBS 처리와 유사하게 첨가 농도가 증가할수록 증식 효율이 증진되는 결과를 보였다(그림 15).

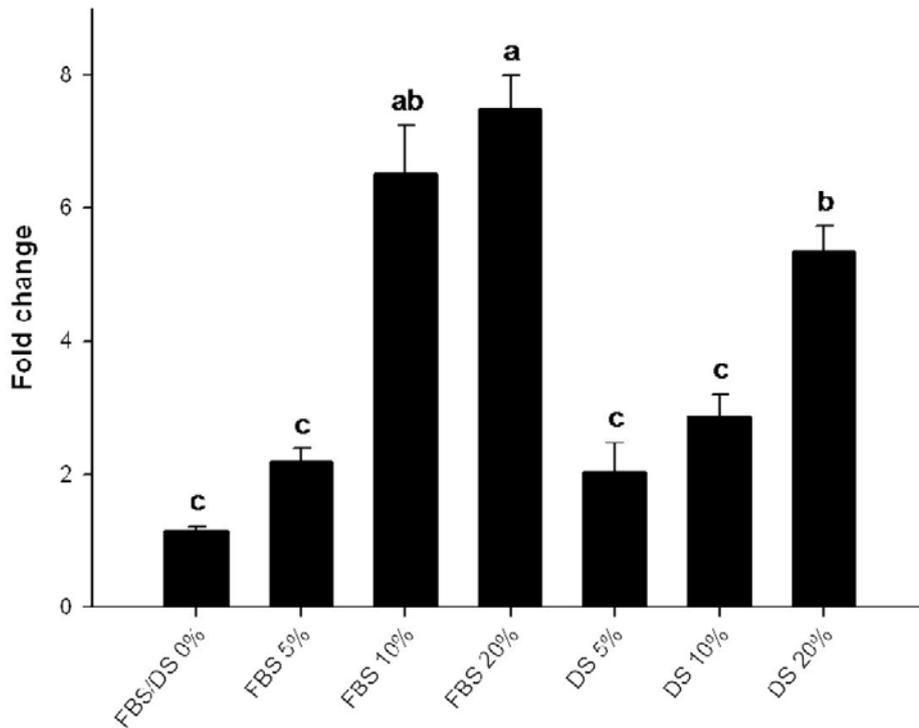


그림 15. 배양액내 첨가되는 혈청의 농도에 따른 녹용 세포의 체외 배양 양상

FBS와 deer serum 간의 비교에 있어서는 10% 이상 고농도 처리시 전반적으로 FBS 처리에서 녹용 세포의 증식율이 높게 나타났다(그림 15). 녹용 세포의 배양시 배양액 내 혈청 첨가 효과에서 FBS 20% 첨가시 가장 높은 배양 효율을 나타내었지만, 유의적인 차이를 보이지 않았던 FBS 10% 첨가 조건을 다음 단계 연구를 위한 기본 조건으로 선정하였다.

라. 배양기내 온도 및 산소가스 농도 효과 검증

녹용 세포의 체외 배양에 적합한 배양기 내 온도 및 산소가스 농도를 알아보기 위하여 배양기 내 각각의 온도(35, 37, 39℃)와 산소가스 농도(5, 10, 20%) 조건에서 1주간 세포를 배양하고 증식 효율을 분석하였다.

(1) 배양기내 온도 처리 효과

- 배양기 내 온도에 따른 세포 증식율은 35, 37, 39℃ 처리군 각각에서 1.8 ± 0.2 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 5.9 ± 0.8 , 3.4 ± 1.1 fold 증진된 결과로서 37℃ 처리에서 가장 높은 증식 효율을 나타내었다(그림 16). 따라서 이후 배양기 내 산소 농도에 따른 세포 증식율은 37℃ 온도 조건에서 실시하였다.

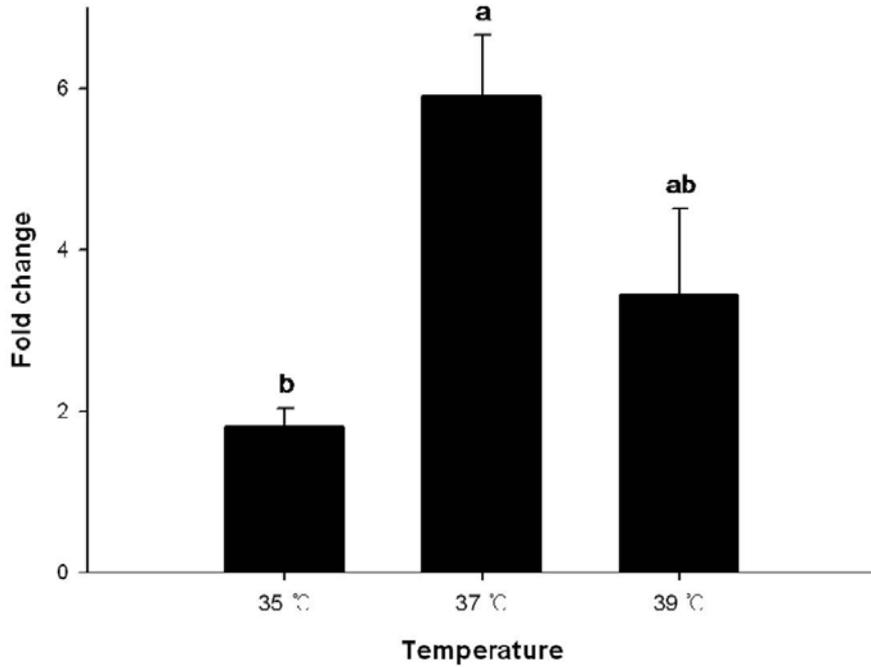


그림 16. 배양기 내 온도에 따른 녹용 세포의 체외 배양 양상

(2) 배양기 내 산소가스 농도 효과

- 배양기 내 산소 농도에 따른 세포 증식율은 37°C 온도 조건에서 실시하였다. 배양기 내 산소 농도에 따라 녹용 세포의 증식율은 5, 10, 20% 처리군 각각에서 1.2 ± 0.2 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 2.5 ± 0.4 , 6.1 ± 0.3 fold 증진된 결과로서 20% 산소 농도 처리군에서 다른 모든 처리군과 비교하여 유의적으로 높은 세포 증식율을 나타내었다(p < 0.05) (그림 17).

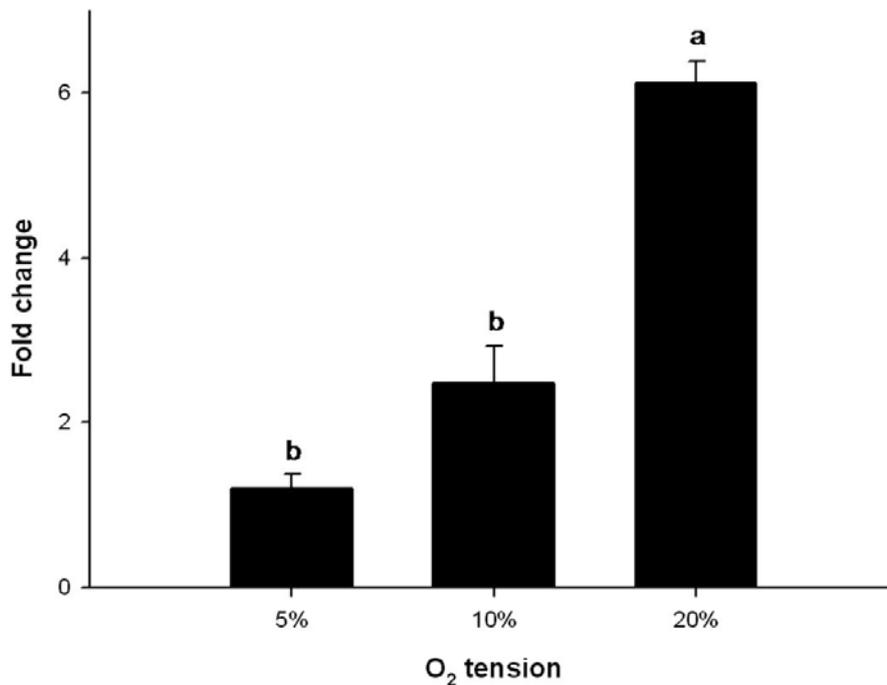


그림 17. 배양기 내 산소가스 처리 농도에 따른 녹용 세포의 체외 배양 양상

따라서 상기 녹용 세포의 체외 배양 조건 검증에 관한 결과를 종합하여 기본 배양 조건 (MEM α 배양액에 FBS 10% 첨가, 37°C, 20% O₂, 5% CO₂)을 선정하였으며, 기본 배양 조건을 이용하여 다음 연구를 진행하였다.

3. 녹용 세포의 체외 배양 효율 증진 조건 검증

가. 배양액 첨가제(supplements), Dexamethasone 및 성장인자(growth factors)의 처리 효과 검증

녹용 세포의 체외 배양에 있어서 증식 효율을 높이기 위하여 세포 증식에 유용성이 예상되는 다양한 제제의 첨가 효과를 검증하였다. 배양액 supplements [L-glutamine 2 mM + β -mercaptoethanol 100 μ M + non-essential amino acid (NEAA) 0.1 mM + HEPES 10 mM]와 dexamethasone (1, 10, 100 nM), basic fibroblast growth factor (bFGF; 10 ng/mL), epidermal growth factor (EGF; 20 ng/mL), insulin-like growth factor-1 (IGF-1; 10 ng/mL), 각각이 첨가된 배양액에서 녹용 세포를 1주간 배양한 후 세포의 증식 양상을 분석하였다. 또한 실험을 통하여 세포증식에 유용한 효과를 보였던 처리들을 병합하여 추가적인 상승 효과 여부를 검증하였다.

- 기본 배양 조건에 supplements 또는 다양한 농도의 Dexamethasone을 첨가하여 녹용 세포의 증식 정도를 조사한 결과, 세포 증식율은 기본 배양 조건만을 사용한 대조군에서 6.7 ± 0.5 fold (mean \pm SEM, n = 3 experiments), supplements 처리군에서 9.4 ± 0.2 fold, Dexamethasone 처리군(1, 10, 100 nM)에서 각각 5.5 ± 0.6 , 5.2 ± 0.7 , 4.1 ± 0.3 fold 증가된 결과를 보였으나 모든 처리군에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 상승 효과는 나타나지 않았다(그림 18).
- 성장 인자의 처리 효과에 있어서는 bFGF, EGF, IGF-1 처리군에서 각각 20.6 ± 0.9 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 9.1 ± 1.3 , 9.8 ± 1.5 fold 증진된 결과를 보였으며, bFGF 처리에서 대조군을 포함한 모든 처리군과의 비교해서 유의하게 높은 세포 증진율을 나타내었다(p < 0.05) (그림 18). 또한 bFGF 처리군에서의 세포 증식 효율은 mesenchymal 세포의 배양을 위하여 특별히 상용화된 고가의 MSC 배양액(13.7 ± 1.8 fold)의 세포 증식율과 비교하여 유의하게 증가된 결과를 보였다(p < 0.05) (그림 18).
- 상기 결과를 토대로 가장 효과가 좋았던 bFGF를 기본으로 대조군과 비교하여 다소 증진된 효과를 보였던 처리들의 복합 처리 효과를 검증한 결과 성장인자 3종류의 복합 처리(3 factors)와 이에 배양액 supplements를 추가(supplements + 3 factors)했던 처리에서 세포 증식율은 각각 26.1 ± 1.0 (mean \pm SEM, n = 3 experiments), 31.0 ± 1.3 fold 증진된 결과로서 복합 처리시 factor가 추가될수록 세포 증식율이 유의적으로 높아지는 경향을 보였으며, bFGF 단독 처리와의 비교에서도 유의적인 상승 효과를 보였다(그림 18).

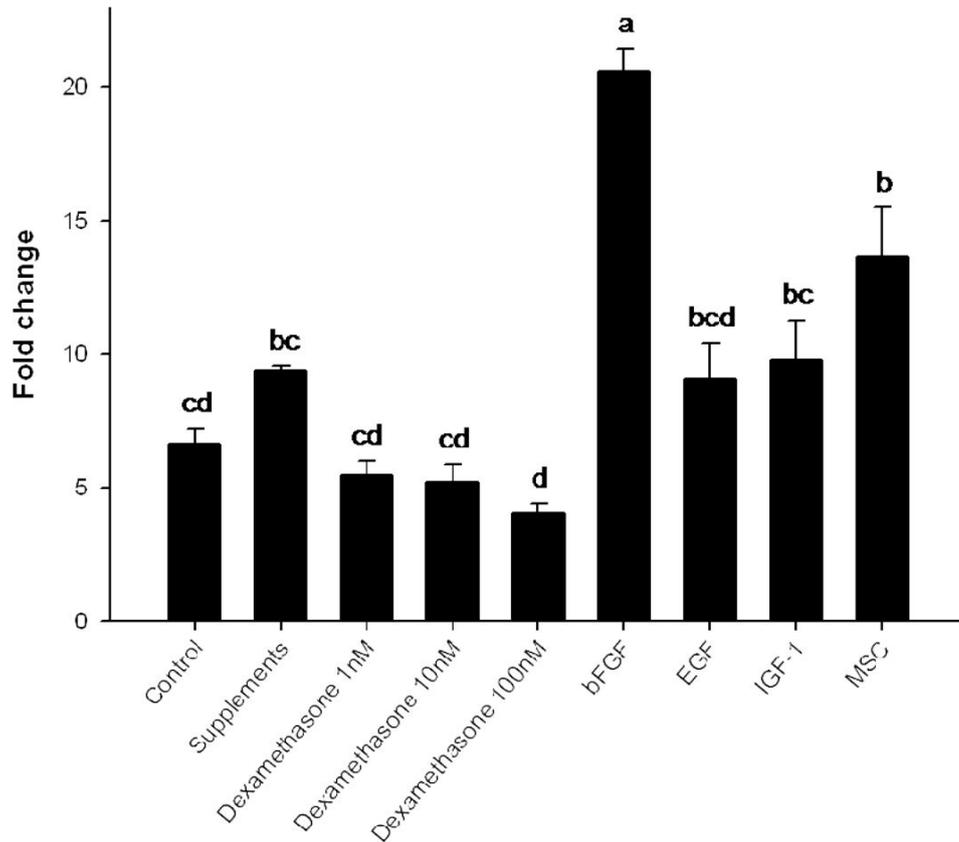


그림 18. 배양액내 첨가제, Dexamethasone 및 성장인자 처리에 따른 녹용 세포의 체외배양 양상

성장 인자들의 단독처리 효과를 검증한 결과 bFGF 처리에서 다른 처리들과 비교하여 유일하게 유의적인 상승 효과를 보였으며, 성장인자들을 복합 처리했을 때 추가적인 상승 효과를 얻을 수 있었다. 상기의 결과를 종합해 보면 bFGF가 녹용 세포의 체외 증식을 위한 key factor 중의 하나임을 확인 할 수 있었다.

나. 체외 배양된 녹용 세포의 특성 분석

체외 배양된 녹용 세포의 특성 분석을 위하여 세포 증식 정도가 가장 높았던 기본 배양 조건에 supplements와 성장 인자의 복합 처리(supplements + 3 factors)를 통하여 체외 배양된 녹용 세포를 대상으로 중간엽 줄기세포 마커인 STRO-1과 CD 90 (Thy-1)의 발현 양상을 분석하였다.

- 배양된 세포들에서 STRO-1과 CD 90 (Thy-1)이 발현되었던 세포의 비율이 각각 $96.1 \pm 1.6\%$ (mean \pm SEM, n = 3 experiments), $97.3 \pm 1.1\%$ 로서 대부분의 세포에서 중간엽 줄기세포의 특이 마커들이 발현되었다(그림 19).

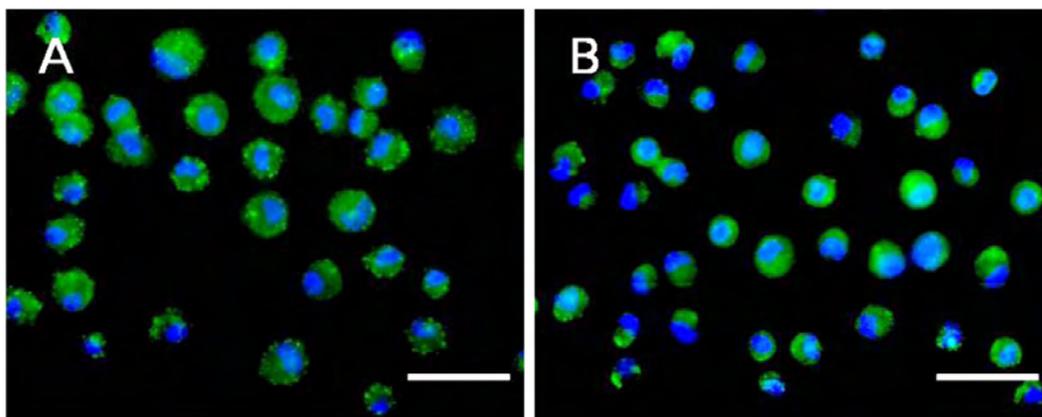


그림 19. 면역세포화학법을 이용한 체외 배양된 녹용 세포의 특성 분석
 * STRO-1 (green; A), CD 90 (Thy-1; green; B), Countstain with DAPI (Blue)

세포 배양 조건에서 배양 증식된 녹용 세포들이 특이 마커의 발현 양상을 토대로 중간엽 줄기 세포의 특성을 지니고 있음을 확인 할 수 있었다.

4. 녹용 세포로부터 생리 활성 물질의 생산과 조직특이 세포주 확립

가. 조직 특이 세포(주) 확립 및 동결 보존

(1) 녹용 세포(주) 제작일 : 2012. 10. 05.

Inventory : Flower deer antler 2개체, Flower deer Pedicle(육경) 2개체 & 3sample, Flower deer ear 1개체, Elk ear 3개체

- 1st/2nd 배양된 flower deer antler는 vial에 각각 2, 3 flower Deer로 표기하였다.
- Pedicle 10, 40, 70 days는 육경 세포로, 낙각 후 채취하기까지 경과한 날짜를 표기하였다.

(2) 귀 세포주 제작일 : 2011. 09. 23

- Flower deer ear cell : 3 vial 제작(추후 충북대, 단국대 등에 공여 세포로 분양).
- Elk ear cell : 2011년 핵이식 시 공여핵으로 모두 사용하였다.

(3) Flower deer antler / Flower deer pedicle / Elk antler cell의 구분
 : RM, Bone, Skin

녹용 및 귀 세포주의 동결 보존액은 기본적으로 DMEM (for STO Cell)과 FBS, DMSO를 혼합하여 사용하였다. 동결 보존액은 1 L 기준으로 DMEM Powder를 5차 증류수(600-700 mL)에 녹인 다음, NaHCO₃ 3.7 g을 넣고 교반한 후, 5차 증류수로 나머지 volume 1 L를 맞추고 최종 교반하였다. 교반된 DMEM에 L-glutamine 12 mL, Penicillin/streptomycin 12 mL, 2-MercaptoEthanol 8 uL를 각각 첨가하고, 0.2 μm 필터디스크로 Filtering하였다. Filtering 후 FBS 84 mL을 첨가하였다. 세포주 동결 시에는 추출한 세포를 배양액(DMEM)에 잘 혼합하여

준비한 후 DMSO : DMEM (for STO Cell) : FBS의 비율을 1 : 3 : 1로 혼합한 최종 동결 보존액[즉, 20% DMSO, 60% DMEM (for STO Cell), 20% FBS로 구성됨]과 세포 부유액을 1 : 1 비율로 섞어준 다음 동결하였다. 따라서, 최종 동결 보존액의 구성은 10% DMSO, 10% FBS, 80% DMEM이었다. 일반적으로 동결보존 시 -80℃ Deep Freezer에 overnight(최소 2시간 이상) 냉동 보관 후 -196도 액체질소 내에 침지하여 동결 보존하였다.

동결 보존 tube (vial)는 1.8 mL cryo vial을 사용하였으며, vial당 세포수가 1.0-5.0 X 10⁶ cell/mL되도록 하여 1mL씩 담아서 동결 보존하였다. 현재 녹용 세포 중 RM 부분을 제외한 Bone/Skin cell을 동결 보관하고 있다(그림 20).



그림 20. 동결 보존된 녹용 및 귀 세포주(공여 핵 용)

나. 녹용 세포의 체외 배양 중 회수된 배양액 내 활성물질 스크리닝 및 시제품 제작

(1) 녹용의 예비 동결 및 생리 활성 물질 추출(생산)

녹용의 급속 동결 건조 및 진공 포장을 위하여 6월 하순부터 8월 초순까지 절각되고 있는 엘크 및 꽃사슴으로부터 분골, 상대, 중대 및 하대(생녹용)를 수집하여 1시간 이내에 실험실로 옮겨와 분리 선별하고 70% 알콜 용액에 30분간 침지시킨 후 꺼내어 미리 무게가 측정된 20-250 mL 진공포장용 병속에 위치시킨 후 급속 동결 시 균열 등을 방지하기 위해서 -10~-30℃의 액체질소 표면 상단 5 cm 위에 정치하여 20-30분간 예비 동결하였다. 녹용을 28시간 이상 동결보관 후 절각된 절편 녹용의 경우에도 상기 방법과 같이 예비 동결 후 동결시켰다. (그림 21)



(동결 건조 전의 녹용 절각)

(예비 동결)

(예비동결 후 동결건조)

그림 21. 녹용의 동결 건조 과정

(2) 동결 건조 처리

예비 동결된 녹용을 영하 40℃ 조정된 동결 건조기내로 옮겨 질량 대비 수분 함량이 8-13% 이하로 될 때까지 동결 건조기(Model No. : MCFD5518, IIShin Lab., 한국)에서 건조하였다. 동결 건조 과정 중 상대, 중대 및 하대에 대한 수분 함량의 변화를 조사하기 위하여 동결 건조 전 무게를 측정하고 동결-건조시킨 결과 각각의 녹용에 대한 질량 대비 감수율은 9일째에 각각 $74.2 \pm 22.4\%$, $52.8 \pm 3.1\%$ 및 $38.5 \pm 2.8\%$ 였다.

(3) 동결 건조 녹용의 포장

동결-건조될 녹용의 포장용기로는 vacuum bottle (10-125 mL) 및 진공 desiccators (Nalgene)를 사용하였으며, 급속 동결된 녹용은 미리 영하 40℃ 이하로 조정된 동결 건조기 (CK-50900, 일신랩)내로 옮겨 9일간 동결 건조 후 10 mTorr 이하의 수준으로 진공 처리 또는 argon gas 및 nitrogen gas로 충전 보존하였다.

(4) 녹용 내 생리 활성 물질의 추출(생산)과 이용

동결 건조 후 녹용 추출액(생리활성물질)은 추후 Essential oil과 프로탈 water로 분리하거나 vacuum bottle (10-100 mL)에 진공포장 후 argon, nitrogen gas로 진공 포장하였으며, 사슴 정액 제조 시 또는 동결 건조 녹용 분말의 이용 시(녹용환 및 캡슐) 및 녹용 체세포의 체외배양 시에 첨가하여 사용하거나 시제품 제조에 이용하였다. 생리활성물질의 탐색은 기반기술 부족으로 국내에서 수행하기 어려운 상태였다. 녹용의 생리활성물질이란 녹용 내에 함유하고 있는 생리적 활성을 일으키는 물질로 특정 물질을 지칭하는 것은 사실상 구명하기 어렵기 때문이었다.

녹용 세포 배양액 내 생리 활성 물질의 재활용을 위해 엘크 및 꽃사슴 녹용의 동결 건조된 추출된 엑기스(추출물)를 동결 건조 후 분말화 된 녹용가루에 재 첨가하여 제조한 녹용 환과 동결 건조 녹용의 분말 및 체외 배양된 녹용 세포의 동결건조 후 분말로 제조된 녹용 캡슐은 그림 22와 같다.



(좌 : 체외 배양 후 동결 건조된 녹용 세포 분말, 중앙 : 녹용 분말, 우 : 녹용 환 및 캡슐)

그림 22. 동결 건조 녹용 세포 분말 및 이를 이용한 시제품

5. 세포주의 효율적인 동결 보존 기법 개발

가. 세포 내 침투 동결 보존제(penetrating cyroprotectant)의 처리 효과

- 동결 보존제 (DMSO, Glycerol, Ethylene glycol, 1,2-Propanediol)를 이용하여 동결-융해 후의 생존율 및 세포 회수율을 검증한 결과 DMSO (83.4%, 68.4%), Glycerol (69.0%, 31.7%), Ethylene glycol (64.3%, 54.7%), 1,2-Propanediol (69.5%, 51.0%)로 DMSO를 처리 하였을 때 가장 높은 생존율 및 세포 회수율을 나타내었다(그림 23).

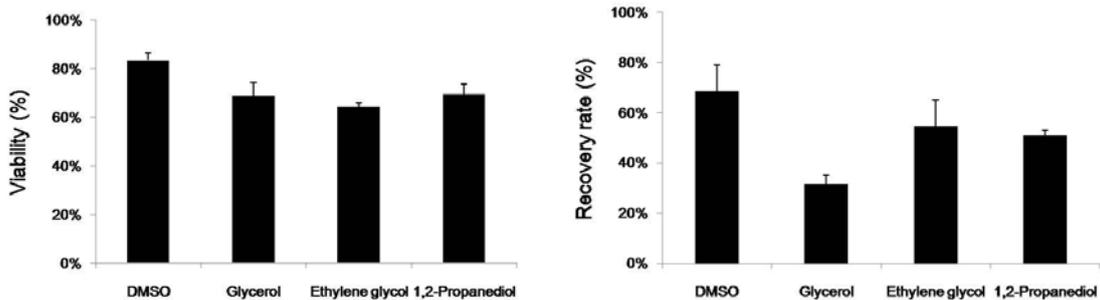


그림 23. 동결 보존제에 따른 동결-융해 후의 생존율 및 세포 회수율

나. 동결 보존액 내 첨가제의 복합 처리 효과

- 상기의 세포내 침투 동결 보존제의 결과를 토대로 동결 보존 효율이 가장 높았던 DMSO 를 선별하여 동결 보존액 내 첨가제 (Trehalose, PEG, Sucrose, Catalase)의 복합처리 효과를 추가적으로 검증하였다.
- 결과적으로 동결-융해 후의 생존율 및 회수율은 Trehalose (93.6%, 78.0%), PEG (86.7%, 75.9%), Sucrose (87.6%, 70.6%), Catalase (79.3%, 55.4%)로 Trehalose를 첨가하였을 때 가장 높은 생존율 및 회수율을 나타냈으며, DMSO (83.4%, 68.4%) 단일 처리 효과와 비교 하였을 때에도 10.3%, 9.6%의 생존율 및 세포 회수율 증진의 효과를 나타내었다(그림 24).

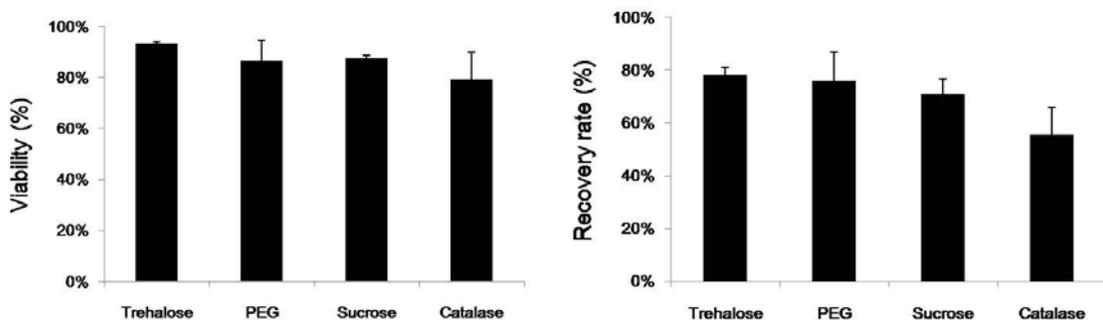


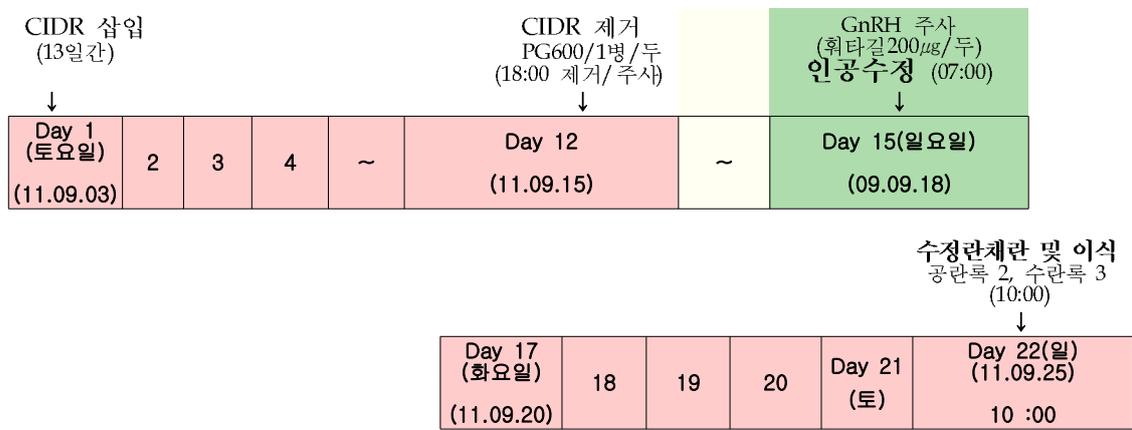
그림 23. 동결 보존제 (DMSO)와 동결 보존액 내 첨가제의 복합 처리에 따른 동결-융해 후 녹용 세포의 생존율 및 회수율

상기 결과를 토대로 녹용 세포의 활용도 증진을 위한 최적의 체외배양시스템 및 효율적인 동결보존 기법은 DMSO 및 Trehalose 첨가가 녹용 세포의 배양에 유리한 것으로 사료되었다.

제 3 절 핵이식 수정란 생산을 위한 다배란 처리 및 난포란의 체외성숙기술 확립

1. 발정동기화 및 다배란 처리

1차년도(2010년)에는 엘크와 꽃사슴의 발정동기화 처리 방법(그림 25)으로 CIDR 또는 Ring-CIDR를 질 내에 삽입하여(그림 26) 14일 동안 정치 시킨 후 제거하고 발정 유도제(FSH 또는 PG 600 등)를 주사하여 발정동기화 및 다배란 처리하였다.



* 이식 1시간 전 Flunixin 350mg 투여
* 과배란 처리 두수에서 수정란을 채란하여, 인공수정 미 실시 두수에게 수정란을 이식 함.

그림 25. 엘크 수정란 생산 및 이식을 위한 발정동기화 및 과배란 처리 방법

다배란 처리된 사슴으로부터 외과적으로 난포란 또는 수정란을 회수하였다. 발정동기화된 사슴은 CIDR 제거 후 60~62시간 때에 인공수정 하였다. 이때 참여 농가에 사용된 정액은 당진군사슴영농조합에서 보유하고 있는 2008년 한국양록협회 최우수 종록으로부터 생산된 정액을 구입하여 사용하였다.(부록 1 - 연도별 시험 추진 내역 참조)



특허명 : 성 호르몬 방출 장치 및 이를 이용한 동물 피임 및 발정 유도 방법(제1263916호, 2013.05.07등록)

그림 26. 꽃사슴 발정동기화를 위한 Ring-CIDR 삽입 및 제거 장면

2차년도(2012년)에는 엘크와 꽃사슴의 발정동기화 처리 방법으로 CIDR 처리에 의한 보정

스트레스를 줄이기 위하여 발정억제제의 급이식 투약법으로 발정을 동기화하였다. 급이식 투약법 발정동기화 처치법으로는 엘크의 경우 MEGA-100 (Melangesterolacetate)을 1일 1회(오전 급이 시) 두당 2.5g씩 섭취될 수 있도록 자가 배합 TMR 사료에 혼합하여 급여개시일(2011. 9. 8)로부터 20일간 급여 후 중단하고 익일 발정을 유도하기 위하여 두당 $PGF_2\alpha$ (Lutalyse) 5ml 및 PG600(PMSG 400IU+hCG 200IU) 5ml를 각각 주사하였으며, 다배란 및 수정란 회수를 위해서는 두당 FSH 3.0 ml를 추가로 주사하였다(발정을 양호하게 유도하기 위한 영양제도 추가 급여하였음). 꽃사슴의 경우에는 Dimethylbesterol (DMS)를 1일 1회 두당 2.0g씩 사료에 첨가하여 급여하였으며, 처리방법은 엘크의 1/2 수준의 호르몬을 투여하였다.

3차년도(2012~2013년)에는 꽃사슴에 대한 발정동기화 및 과배란 처리방법으로 1안의 경우에는 번식계절 도래시 GnRH 주사하고 1주일 후에 $PGF_2\alpha$ + PG 600(또는 FSH) 주사한 다음 48시간 후에 난포란 채란하였으며, 2안의 경우에는 번식계절 중에 $PGF_2\alpha$ 를 주사하고 2일 후에 PG 600 + GnRH 주사한 다음 48시간 후 난포란 채란하였다.(부록 1 - 연도별 시험 추진 내역 3차년도 참조)

한편 발정 및 과배란 유도제로 PG 600과 FSH를 주사하여 난포발달을 유도하였으며, 발정을 동기화시키는 방법으로 GnRH 및 $PGF_2\alpha$ 를 처리하였으며 난포란의 회수는 다배란 처리된 사슴으로부터 외과적으로 수정란을 회수하였다. 발정이 동기화된 사슴은 채란과 이식 시간을 맞추기 위해서 처리되어졌다. 다른 한편으로 참여 농가에서 번식계절 도래시 안정적인 자육 생산을 위해 발정동기화 처리 후 자연 종부에 의한 규모화 종부(교배)를 실시하였다.(부록 1 - 연도별 시험 추진 내역 3차년도 참조)

2. 난포란 채란과 체외 성숙

가. 외과적 난포란 채란

사슴을 마취시킨 후 외과적으로 난포란을 채란하였다. 전신 마취 후 복부에 리도케인으로 국소 마취시킨 후 절개하여 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난소 표면의 난포에 주사침(19G)을 찔러 음압을 작용시켜서 채란하였다. 채란 시 간혹 배뇨되지 않은 사슴의 경우에는 난소 도출이 매우 어렵는데 이때에는 이노제를 주사하였다. 채란된 난자는 30~35℃의 배양액에 담아 실험실로 옮긴 후 2~3회 세척한 후 현미경으로 난포란을 채집하였다.(그림 27, 그림 28).



그림 27. 꽃사슴의 다배란 처리 난자의 회수(외과적 수술) 및 검경



그림 28. 엘크 사슴에 있어서 외과적 수술에 의한 난포란의 채란

나. 비외과적 난포란 채란

(1) OPU(Ovum Pick-up, 난자직접채취기술)의 이용

OPU(Ovum Pick-up, 난자직접채취기술)란 살아있는 엘크 사슴으로부터 마취 및 복부 절개에 의한 수술없이 직장질법과 유사하게 질 내에 비닐로 피복된 초음파 probe(EC4-9 13R, 6.5MH, 대형동물용., CE0123, IPX7, 중형동물용. 메디슨. 한국)을 오른손으로 삽입하고, 왼손으로 거머쥔 난소쪽으로 probe를 전진시켜 화상에서 근접된 주사침을 확인 후 난포강 내로 주사침을 전진시키고 음압을 작용시켜 채란하였다.(그림 29.)

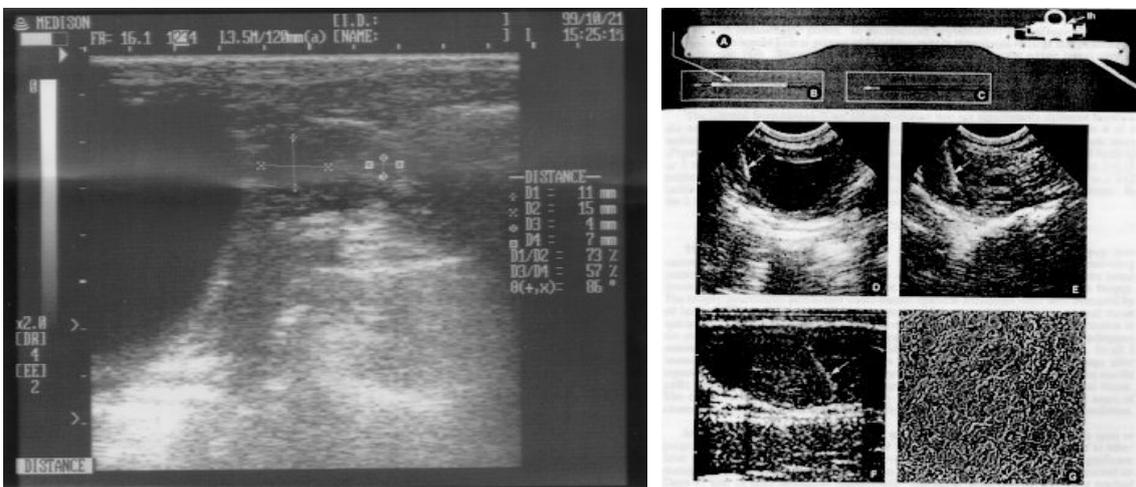


그림 29. 엘크의 발정주기 18일째 난포발달에 대한 초음파 화상

난소에서 초음파 기구를 이용해 난자를 직접 채취하는 첨단기술로써 기존의 수정란 생산 방법과 다른 점은, 첫째로 난자 채취용 암사슴(공란록)에 호르몬을 사용하지 않아 암사슴의 건강과 호르몬 내성에 대한 번식기관의 안전성을 확보할 수 있으나 마취와 시술시 보정틀 내에서 강제한 스트레스 때문에 사슴의 경우 비효율적이라 판단되었다.

(2) 화상 내시경 채란기 이용

화상 내시경 채란기란 그림 30과 같이 복부 절개에 의한 수술 없이 유도침으로 하복부를 천공한 후 유도관을 통하여 내시경을 삽입한 후 복강 내에 CO₂ 가스를 주입하여 내시경의 시야를 확보한 후 제 2, 제 3의 내시경을 복강 내에 삽입하여 상호 조작에 의한 주 내시경을 난소 표면에 접근시켜 난포란을 채란코자 하였으나 장비 구비의 미흡으로 난포란 채란은 실패하였다. 주 내시경 선단의 난소 접근이 매우 지난하여 화상 내시경적 난포란 채란은 사실상 불가능한 기술로 사료되었다.

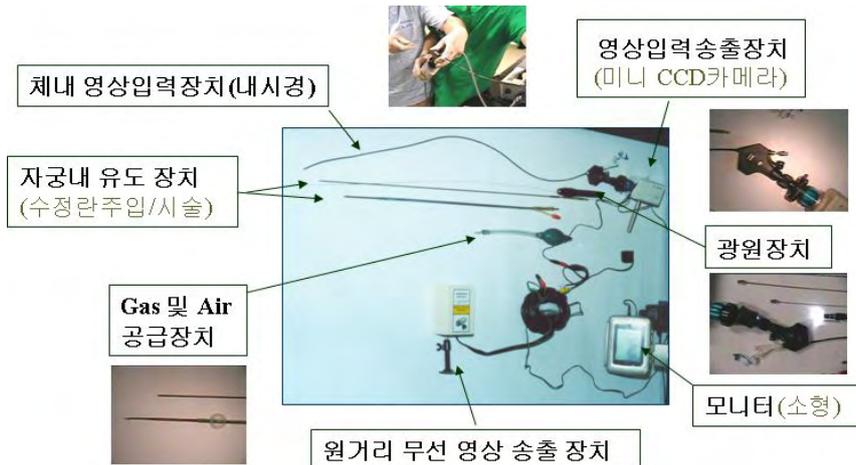


그림 30. 채란 및 수정란이식을 위한 화상 내시경 시스템 모식도

다. 난포란 및 난소의 체외 배양

(1) 난포란의 체외 배양

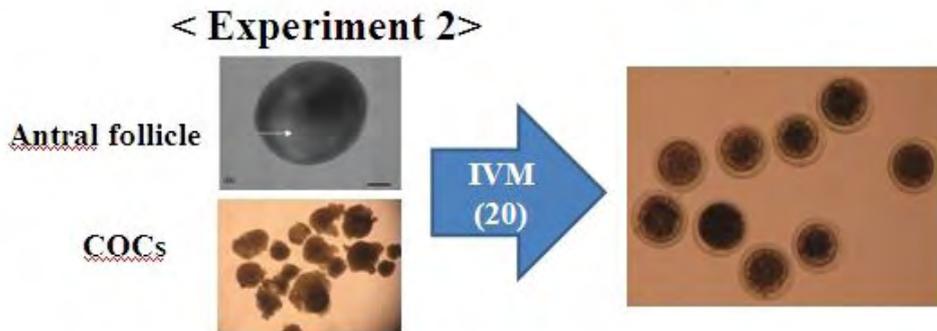
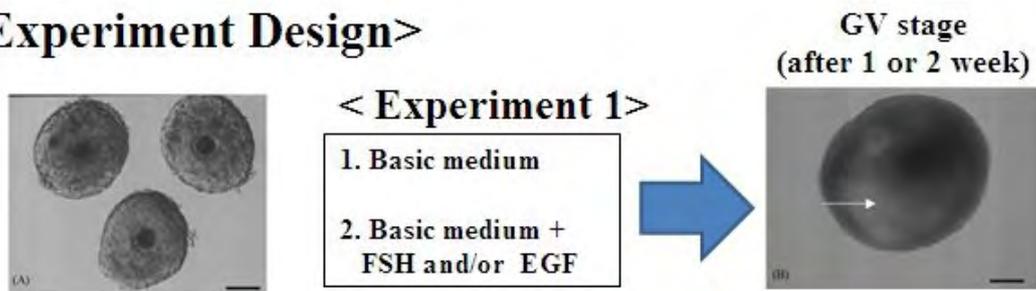
채란용의 배양액은 HEPES-buffered medium 199(H199, cat NO. 31100-035)에 15mM HEPES, 5mM NaHCO₃, 0.086mM Kanamycin monosulfate, 925IU/ml heparin, 20ul/ml 20% BSA(albumin)를 첨가하여 사용 24시간 전에 제조하였다. 채란된 난포란은 H199 에 10% FCS 가 첨가된 배양액에 2번 세척하고 Bicarbonate-buffered M199에 25mM NaHCO₃, 0.2mM pyruvate, 0.086mM Kanamycin, 10%(v/v) FCS가 첨가된 배양액에 1번 세척 후 10mM B199-10 용액에 난포란을 7~10개 넣고 6cm dish 내의 40ul IVM용액(B199-10용액+10ug/ml ovine FSH, 1ug/ml ovine LH, 1ug/ml 17-β-estradiol, 0.1mM Cysteamine) 속으로 옮겨서 파라핀으로 피복 후 인큐베이터에서 19~20시간 배양하였다. 배양 후 성숙된 난자는 성숙율을 조사한 다음 1mg/ml hyaluronidase가 들어있는 HEPES-buffered+난관관류액(100mM NaCl, 6.0mM KCl, 0.6mM MgSO₄×7H₂O, 0.069mM Kanamycin, 20mM HEPES, 5mM NaHCO₃, 0.33mM PYRUVATE, 3.0mM L-lactic acid hemicalcium salt, 1mM glutamine, Eagle's basal medium essential amino acids 50×, MEM non essential amino acids 100×, 3mg/ml fatty acid-free bovine albumin) 50ml 용액에서 가볍게 교반하여 난구세포를 제거한 후 H-DSOF용액 (0.1mg/ml cold soluble polyvinyl acetate 10~30 KDa가 들어있는)에 2번 세척하여 polar body

가 형성된 난자만을 골라서 5ug/ml Hoechst 33342 + 7.5ug/ml cytochalasin B가 들어있는 H199-10 용액으로 5분간 염색한 후 20~21시간 때에 제핵하였다. 이때 핵이식을 위한 공여 핵은 동결보관된 녹용세포(또는 귀 세포)를 용해하여 2.5×10^4 cell/cm로 조정하여 17-20시간 전에 미리 배양한 후 PBS로 3번 정도 세척한 다음 DMEM/F12(0.5% FCS)배양액에서 4일 정도 추가 배양한 녹용세포의 핵을 준비하였다.

(2) 난소의 체외 배양

본 시험은 사슴으로부터 난포란을 외과적으로 채란한 후 난소 자원을 더욱 활용하기 위해서 적출된 난소의 체외 배양을 통하여 난자를 확보할 수 있는 가능성을 모색하고자 그림 31과 같은 실험계획에 의하여 실시하였다. 꽃사슴으로부터 가시(可視) 난포란을 채란한 후 그림 32와 같이 난소를 적출하였다. 적출된 꽃사슴 난소는 새끼 손가락의 손톱 마디 정도였다. 적출된 꽃사슴 난소는 실험실로 옮겨와 세척한 후 체외 배양 시 FSH 및 EGF가 발달에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

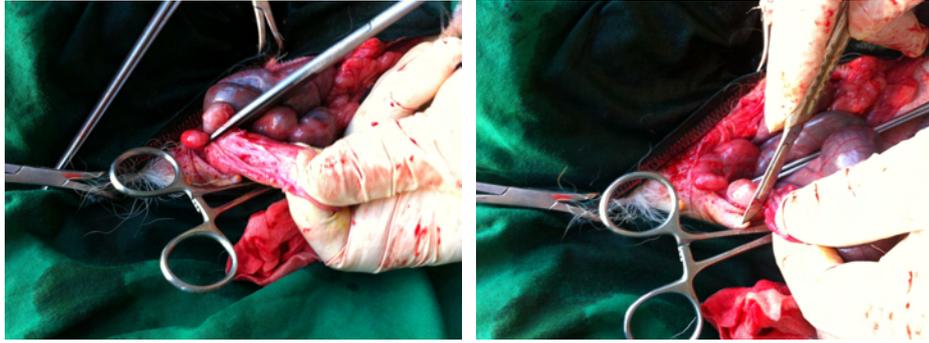
< Experiment Design >



1. Follicles surviving(%) and Antrum formation(%)
2. Diameter of deer preantral follicles on various days of culture in media supplemented with FSH and/or EGF.
3. Examine the embryo production ability of the oocytes derived from preantral follicles.
4. Maturation rate (percentage of GV, GVBD, MI and MII)
5. Distribution of chromosome, microtubule and actin at MII stage.
6. Distribution of microtubule aster in IVF or NT embryos(1h, 6h or 12h after IVF or NT)
7. Developmental ability of IVF or NT embryos.

그림 31. 난소 배양을 위한 시험 디자인(계획)

꽃사슴으로부터 난소 적출 후 난소 배양을 위해 다음의 <난소의 체외배양 방법>과 같이 처리하였다.



32. 난자 자원을 확보를 위한 꽃사슴의 난소 적출

그림 32에서 보는 바와 같이 양호한 난포란으로부터 채란한 다음 난소를 적출하여 시험에 공시하였다.

<난소의 체외 배양 방법>

- (1) Ovaries were recovered, washed in 70% ethanol for 10s, followed by rinses in Medium Essential Medium(MEM) supplemented with 100ug/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 25mM HEPES.
- (2) The ovaries were transported(at 4°C) to the laboratory within 1 h after they were recovered.
- (3) Fat and connective tissue surrounding the ovaries were removed. Cortical slices (1 to 2 mm thick) were cut with a surgical blade (under sterile conditions) and placed in a fragmentation medium consisting of HEPES-buffered MEM.
- (4) Preantral follicles that were approximately at least 200 um in diameter were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from strips of ovarian cortex using 26-gauge (26 G) needles.
- (5) After isolation, follicles were transferred to 100 ul drops containing fresh culture medium under mineral oil to further evaluate follicular quality. Follicles with a visible oocyte that were surrounded by granulosa cells and had an intact basement membrane and no antral cavity, were selected for culture.
- (6) After selection, follicles were individually cultured in 100 ul drops of culture medium in petri dishes (60 x 15 mm, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). The basic culture medium consisted of - MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 g/mL insulin, 5.5 g/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 g/mL ascorbic acid, and recombinant bovine FSH (rFSH, Nanocore, Campinas, São Paulo, Brazil) at appropriate growing

concentrations (100 ng/mL until Day 6, 500 ng/mL until Day 12, and 1000 ng/mL until Day 18 of culture) under mineral oil.

- (7) Incubation was carried out at 39 °C, in 5% CO₂ in air for 18 d. Fresh media were prepared and incubated for 2 h prior to use. Every other day, 60 L of medium were replenished in each drop, and, at Days 6 and 12 of culture, all the medium (100 L) was replenished with fresh medium. The culture was replicated four times, and at least 41 follicles were used in each treatment.
- (8) Following culture, all healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope for oocyte retrieval. Only oocytes >110 μm, with homogeneous cytoplasm that were surrounded by at least one compact layer of cumulus cells, were selected for IVM.

3. 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.1을 이용하여 최소 유의차 검정(Least Significant Different test; LSD test)과 General linearmodel(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차($p < 0.05$)을 검정하였다.

4. 결과

가. 다배란 처리방법이 난소 반응 및 난포란 회수 성적에 미치는 영향

(1) 호르몬 처리 방법이 난소 반응 및 난포란 발달에 미치는 영향

엘크 12두와 꽃사슴 10두에 대해서 발정동기화 처리 방법으로 CIDR 또는 Ring-CIDR를 질 내에 삽입하여(그림 26) 14일 동안 정치 시킨 후 제거하고 발정 유도제(FSH 또는 PG 600)를 주사하여 발정동기화 및 다배란 처리한 후 다배란 처리된 엘크 및 꽃사슴 각각 2두로부터 외과적으로 난포란을 회수하였을 때 난소 반응 및 채란된 난포란의 수는 표 6과 같았다.

표 6. 다배란 처리 후 엘크 및 꽃사슴의 난소 반응 및 채란 결과

Species/Breed	ID	Good	Fair	Poor	Total	Remarks
Elk	123	7			7	
Elk	127	4	3	4	11	Additional collection from a removed ovary
Sika deer	115	3			3	
Sika deer	117	10		4	14	From removed ovaries
Total		24	3	8	35	

다배란 처리 후 회수된 양호한 난자는 엘크가 11개, 꽃사슴이 13개였다(표 6).

(2) 급이식 호르몬 처리 방법이 난소 반응 및 난포란 발달에 미치는 영향

엘크와 꽃사슴의 발정동기화 처리 방법으로 CIDR 처리에 의한 보정 스트레스를 줄이기 위하여 발정억제제의 급이식 투약법으로 발정을 동기화하였는 바, 엘크의 경우에는 MEGA-100 (Melangesterolacetate)을 1일 1회(오전 급이 시) 두당 2.5g씩 섭취될 수 있도록 자가 배합 TMR 사료에 혼합하여 급여개시일(2011. 9. 8)로부터 20일간 급여 후 중단하고 익일 대량 난포 발달을 유도하기 위하여 두당 $PGF_2\alpha$ (Lutalyse) 5ml 및 PG600(PMSG 400IU+hCG 200IU) 5ml를 각각 주사하였으며, 다수의 난포란 회수를 위해서 두당 FSH 3.0 ml를 추가로 주사하였다(발정과 다배란을 양호하게 유도하기 위한 영양제도 추가 급여하였음). 꽃사슴의 경우에는 Dimethylbesterol (DMS)를 1일 1회 두당 2.0g씩 사료에 첨가하여 급여하였으며, 처리방법은 엘크의 1/2 수준의 호르몬을 투여하였다. FSH 투여 후 24시간 때에 외과적 수술에 의하여 난소 반응을 조사하고 난포란을 채란한 결과는 표 7과 같았다.

표 7. 다배란 처리된 엘크 및 꽃사슴의 난소 반응과 채란 결과

Species /Breed	ID	No. of follicles (L/R)	No. of recoved			Total	Remarks
			Good	Fair	Poor		
Elk	126	백체1, 소1/백체, 소, 대		3		3	
	129	대1, 소3/황체1, 소		1		1	
	131	소7/소5	1	4		5	
	132	중2/중1		1		1	
	소계		1	9		10	수송에서 문제 발생
Flower deer	18	대2,중2.소1/대1, 중1,소1	9	3	2	10	좌10, 우4
	20	대2,중2/대2,중2	2			2	좌1, 우1
	24	대3,중1.소1/대1, 중1,소1	4	6	5	15	좌9, 우6
	126	대3,중2/중2,소1	2	1	5	8	좌5, 우3
Total	소계					39	

다배란 처리 후 난소에서 회수된 난자는 엘크가 10개, 꽃사슴이 39개 였다(표 7). 호르몬 처리에 대한 난소 반응은 대체로 꽃사슴의 경우가 엘크보다 훨씬 양호하게 나타났다.

(3) 성선자극호르몬 투여가 사슴 난소 반응 및 난포란 발달에 미치는 영향

꽃사슴 난포란의 대량 생산을 위해 꽃사슴 18두에 대해 각각 6두씩 2회 반복 처리하였으며 **Group I** 은 발정도래 시기(9월 말)에 GnRH(휘타길 1.5ml)를 주사하고 1주일 후에 $PGF_2\alpha$ (Lutelys 1.0ml)와 PG 600(1.5ml)**을 주사하고 48시간 후에 수술하여 난포란을 채란하였으며, **Group II**는 번식계절 중(10~12월)에 대해 $PGF_2\alpha$ (Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 PG 600(1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 때에 채란하였으며, **Group III**도 번식계절 중에 $PGF_2\alpha$ (Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 FSH(Folltropin V, 1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 때에 채란하여 각 Group에 대해 난포수와 회수된 난포란의 수를 조사하였다. 꽃사슴의 호르몬 및 마취제 투여는 블루건으로 주사

하였으며, 마취는 썩시콜린(50mg/ml) 4ml + 증류수 6ml + 자이진 2ml를 희석한 용액을 두당 체중에 따라 0.3~0.5ml를 주사하였다. 마취 후 복부를 절개한 후 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난포수를 조사하고 난포에 주사침(19G)을 찔러 음압을 작용시켜서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 배양액(HI99-10)에 세척한 후 현장에서 현미경으로 수집하여 난포란의 등급별로 수를 조사한 결과는 표 8과 같았다.

표 8. 성선자극호르몬 처리 방법에 따른 난포란의 회수율

Group	No. of follicles					No. of recovered ovum	Recovery (%)
	Total	Mean±SD	Good	Fair	Poor		
I	100	8.3±3.2	56	32	12	73	73.0
II	103	8.6±3.2	16	57	30	76	73.8
III	290	24.2±5.4	14	245	31	219	75.5

* Group I : GnRH를 주사 ⇨ 1주일 후에 PGF₂α + PG 600 주사 후 48시간 때에 채란.
 Group II : PGF₂α 주사 후 2일 후 PG 600 + GnRH 주사 후 48시간 때에 채란.
 Group III : PGF₂α 주사 후 2일 후 PG 600 + FSH 주사 후 48시간 때에 채란.
 ** PG 600 : ml당 PMSG 400IU+hCG 200IU가 함유되어 있음.

본 연구 결과 꽃사슴의 난포발달은 번식계절 중(Group II)이 번식계절 도래 시(Group I)보다 호르몬 처리에 대한 반응이 높게 나타났으며(8.6±3.2 vs 8.3±3.2), 난포발달에 영향을 미치는 호르몬처리로 GnRH(Group II)와 FSH(Group III)처리에서는 FSH 처리가 난포발달 및 회수율이 높게 나타났다(p<0.05).

나. 비외과적 난포란 채란 방법이 난포란 생산에 미치는 영향

꽃사슴에 대해 OPU 및 화상 내시경 채란기를 이용한 난포란 채란 결과는 표 9와 같았다.

표 9. 사슴 난포란의 비외과적 채란 방법에 따른 채란 성적

채란 방법		처리 두수	채란된 평균 난포란 수	비고
외과적 수술		4	8.6	
비외과적 시술	OPU	2	2.4	개발 가능성이 다소 높음
	화상 내시경	2	-	개발 가능성이 거의 없음

난포란의 비외과적 채란 시 OPU 및 화상 내시경적 채란은 시술 사슴에 대한 외상은 적어 유리한 듯 하였으나 시술 사슴에게 과도한 스트레스와 장기 손상이 초래되어 외과적 수술에 의한 채란 성적보다 유리하지 못하였다.

다. 과배란 처리 시 성선자극호르몬이 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

1차년도(2010년)에 엘크 및 꽃사슴으로부터 채란된 난포란의 체외성숙율(MII)은 20% 수준이

었다. 이때 회수된 난포란에서 체외 성숙시킨 난포란은 각각 10개 및 21개 뿐이었으며 채란 및 난포란 처리 미숙에 많은 난포란 손실이 있었다.

체외 성숙전과 체외성숙 후의 난포란 상태는 그림 33과 같았다. 사슴 난포란을 20시간 체외 배양하여 성숙시킨 결과 1차년도와 2차년도에 비해 체외성숙율(MII)은 20% 수준이었으며, 2차년도에는 50% 수준이었고, 3차년도에는 표와 같이 75.0~75.8%까지 향상시킬 수 있었다.

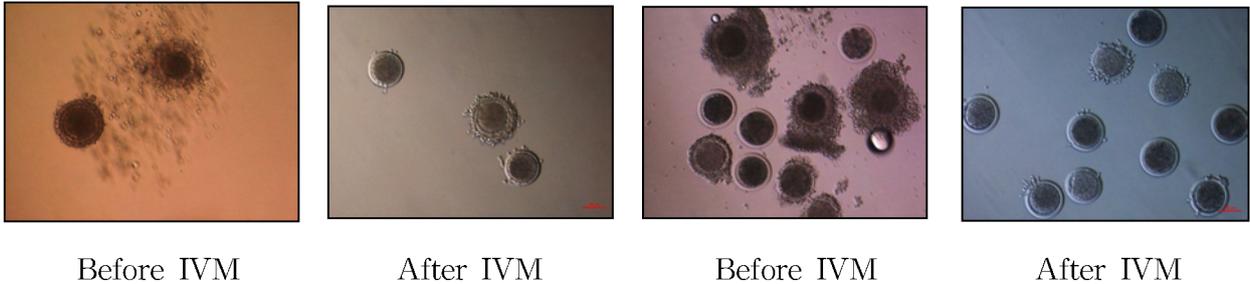


그림 33. 꽃사슴(좌) 및 엘크(우) 난포란의 체외 성숙 결과

난포란의 체외성숙시스템 확립된 시점에서의 성숙 배양액의 조성은 TCM-199에 10% FBS (v/v), 0.2 mmol/L sodium pyruvate, 25 mg/mL gentamycin sulfate, 1 mg/mL follicle-stimulating hormone (Stimufol; Merial, Lyon, France), 1 mg/mL estradiol-17b and 0.57 mmol/L cysteine이 첨가되었다. COCs를 37도 혹은 38.5도의 조건하에서 체외배양을 하였을 때 MII단계의 성숙율은 유의적 차이가 없었다.(75% vs 78.5%). 채란된 꽃사슴 난포란을 배양온도에 따른 성숙율을 조사한 결과는 표 10과 같았다.

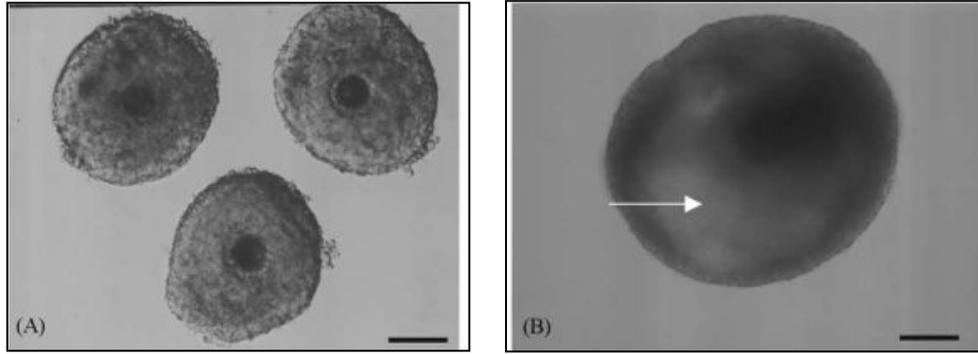
표 10. 꽃사슴 난포란의 배양 온도에 따른 체외 성숙율

배양 온도	미성숙난포란 수 (No.of COCs)	성숙된 난포란 수(No.of MII, %)
37°C	16	12 (75.0)
38.5°C	93	73 (78.5)

꽃사슴 난포란을 배양온도에 따라 각각 16개 및 93개의 난포란을 성숙시킨 결과 38.5°C의 배양온도가 꽃사슴 난포란의 체외 배양에 다소 유리하였다.

라. FSH 및 EGF가 꽃사슴 난소 발달에 미치는 영향

외과적으로 난포란을 채란 한 후에 추가적인 난포란 생산을 위하여 난소를 적출하여 실험실로 가져와서 소독한 다음 세절한 후 18일 동안 배양한 결과는 그림 34와 같았다.



(체외 배양액 : 기본배양액 + FSH and/or EGF)

그림 34. 꽃사슴 난소 배양 결과

그림 34에서 보는 바와 같이 꽃사슴 난소를 인큐베이트에서 18일 동안 배양하였을 때 세절된 난소 세포의 생존율은 확인하지 못했으며, 제2 난모세포(preantral follicle)가 성숙하여 난포강이 있는 난모세포로까지도 발달하지는 못하였으나 난포강 형성에 가깝게 성장한 것으로 사료되었다. 그러므로 난소 배양 시 FSH and/or EGF가 난모세포의 발달에 미치는 영향은 매우 미미한 것으로 사료되었다.

제 4 절 체외성숙 난포란으로부터 핵이식 수정란의 생산

기본적으로 사슴의 복제수정란 생산은 그림 와 같이 실시하였다. 그림 35에서 보는 바와 같이 인공수정기법과 동일하게 호르몬 처리에 의한 발정 및 다 난포발달을 유도하고, 체란(난포란 회수) 및 체외 성숙시킨 후 복제수정란 생산을 위해 수핵란 핵제거 - 공여세포 핵 주입 - 세포 융합 - 복제 수정란의 수란록 이식과정을 거치게 하였다.

< 사슴 핵이식 수정란 생산 모식도 >

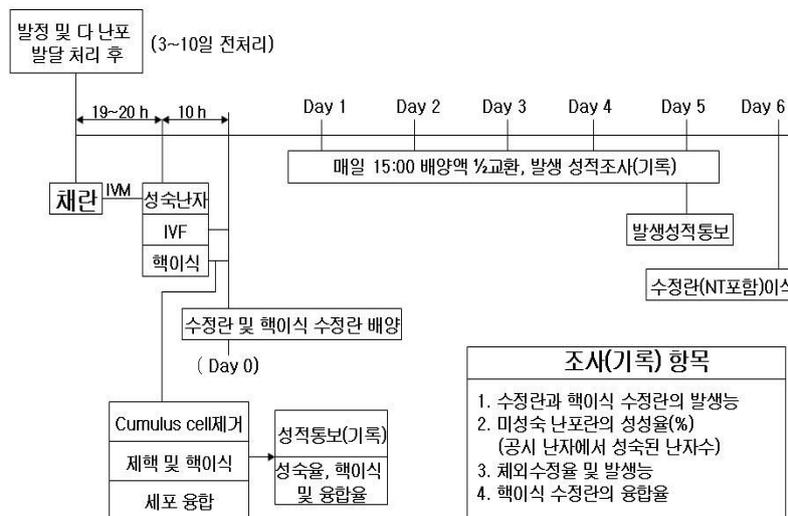


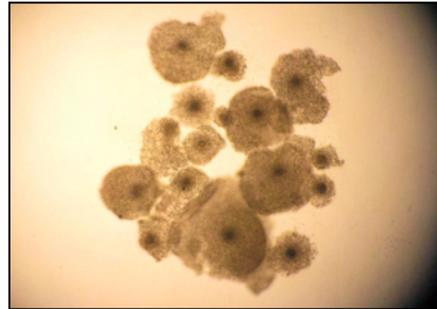
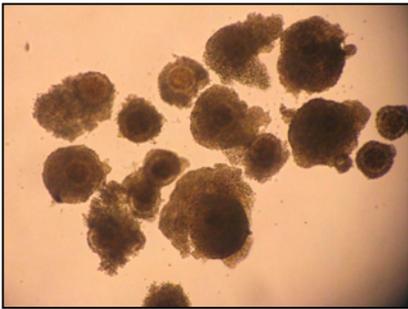
그림 35. 사슴 핵이식 수정란 생산 모식도

1. 복제 수정란 생산을 위한 공여핵 세포 및 성숙 난포란 준비

핵이식수정란을 생산하기 위하여 공여핵으로는 그림 36과 같이 엘크의 경우에는 RM cell(P-2)를 사용하였으며, 꽃사슴의 경우에는 pedicure cell(육경세포, P-4)를 사용하였다.



Elk RM cell (P-2) Flower deer pedicure cell (P-4)
그림 36. 엘크 및 꽃사슴의 공여핵세포



다배란 처리 후 회수된 꽃사슴 난포란 회수된 난포란을 24시간 배양 후의 꽃사슴 난자
그림 37. 채란된 꽃사슴 난포란의 성숙 전.후의 상태

그림 37은 채란된 난포란의 성숙 전.후의 상태이며, 그림 38은 난구세포를 제거한 MII 단계의 난자(극체 방출 상태)의 사슴 난자이다.

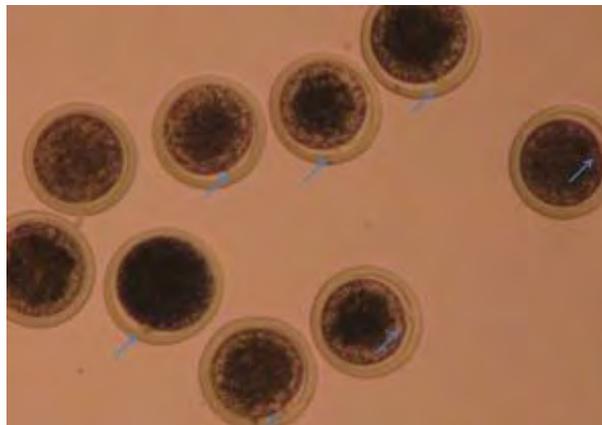


그림 38. 꽃사슴의 난구세포를 제거한 MII 단계의 난자(극체 방출 상태)

방출된 극체는 그림과 38과 같이 화살표로 표시하였으며, 이러한 극체의 방출은 성숙된 난자를 시각적으로 쉽게 판정할 수 있는 방법으로 적용할 수 있었다.

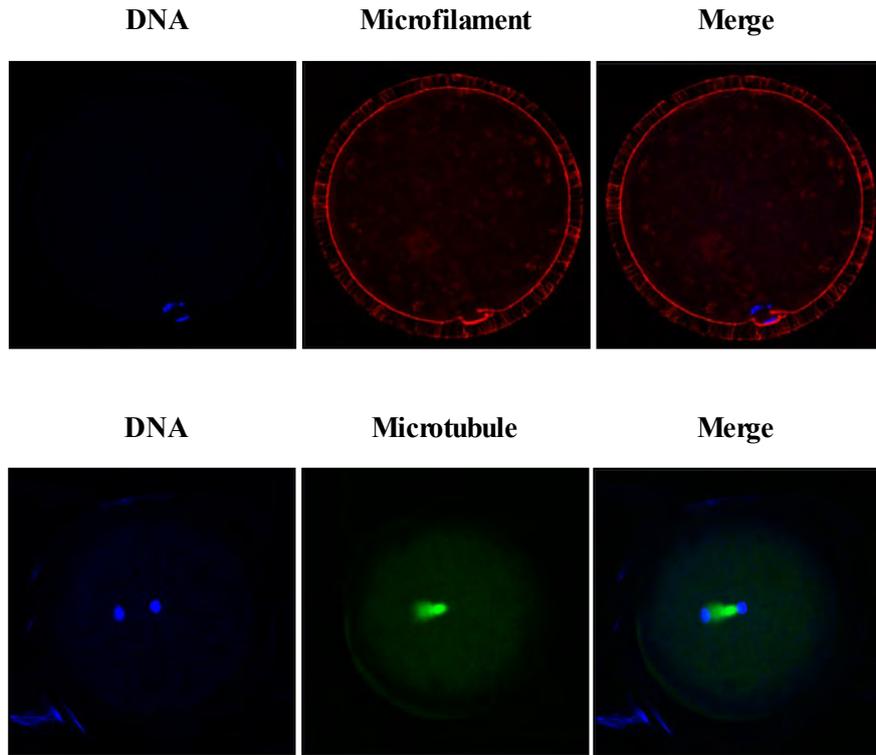


그림 39. 체외 성숙된 사슴 난자의 형광염색 결과

그림 39는 성숙된 난포란의 성숙 정도를 평가하기 위하여 MII 단계의 난자를 microfilament와 DNA에 대해 형광 염색을 실시한 결과이다.

III 단계의 성숙 난포란(난자)을 microfilament와 DNA를 염색한 결과 위 사진의 적색부분은 난자의 microfilament를 나타내고 있으며, 아래 사진은 난자의 MII 단계의 미세소관을 염색한 것으로 late-MI 단계의 난자인 것으로 확인되었다. 즉 이 난자는 아직 완전히 MII까지 발달하지 상태임을 알 수 있었다.

2. 복제 수정란 생산을 위한 세포 융합 결과

엘크 및 꽃사슴의 핵 융합을 위하여 먼저 그림 40과 같이 성숙난자에서 제핵을 실시하였다. 제핵된 난자의 세포융합을 위한 융합조건으로 2.25kv/cm, 15microsec, 2pulse로 실시하였으나, fusion이 이뤄지지 않아서 다른 조건인(돼지의 융합조건) 1.5kv/cm, 45microsec, 2pulse로 추가하여 fusion을 실시한 결과는 그림 14와 융합에 성공하였다. 사슴 난포라로부터 체외성숙하여 제핵하고 핵이식한 결과 꽃사슴의 경우에는 모두 실패하였으며, 엘크의 경우에는 131개체의 성숙난포 1개에서 fusion이 이뤄졌으나, cleavage는 관찰되지 않았다(표 4).

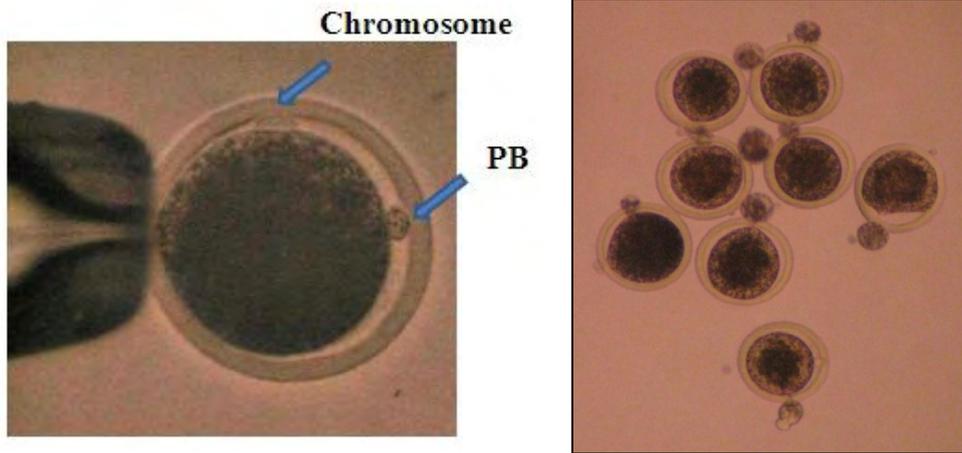


그림 40. 성숙 난포란으로부터 핵이 제거된 난자

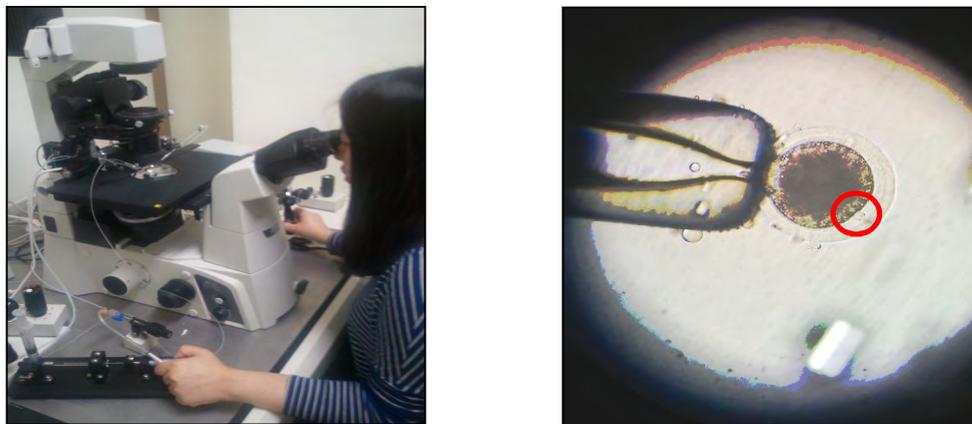


그림 41. 사슴 난포란으로부터 제핵 및 세포 융합 결과

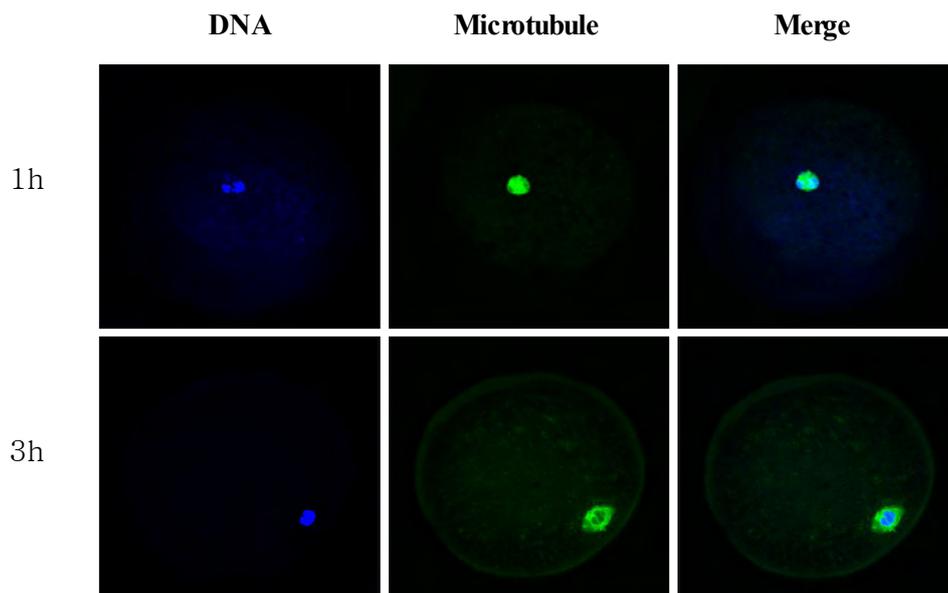


그림 42. 융합 후 1 시간 및 3시간 후의 크로마틴 변화

그림 42는 공여세포와 세포질을 융합 시킨 후 1시간, 3시간째 염색질을 형광염색한 사진이다. 그림 42에서 상단의 3개 사진에서는 크로마틴이 응축되어 있고 미세소관은 응축된 크로마틴에서 생성된 것을 관찰할 수 있었다. 아래 3개 사진에서는 미세소관이 응축된 크로마틴에 방추체 모양으로 형성되어 있음을 확인할 수 있었다.

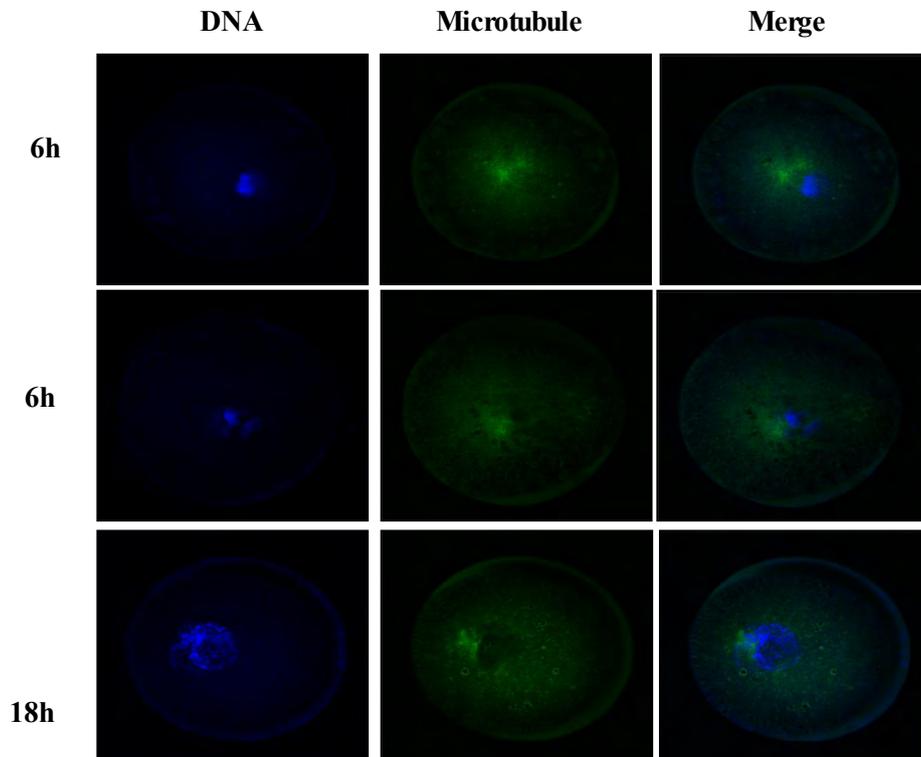


그림 43. 융합 후 18시간 동안의 크로마틴 변화

그림 43에서는 융합 후 6시간 때에 크로마틴이 두개의 전핵 비슷한 구조로 분열되고 미세소관 성상체는 크로마틴 근체에서 관찰할 수 있었다. 그리고 융합 18시간 후에는 크로마틴이 두개의 swelling 된 전핵으로 형성되었으며 크로마틴 근처에서 더 큰 성상체를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 융합 후 핵이 이식된 수정란이 정상적으로 발달하고 있음을 확인할 수 있었다.(그림 44)

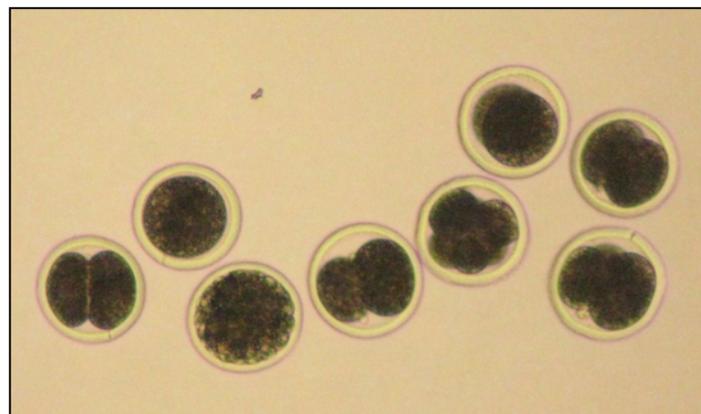


그림 44. 융합 후 4일까지 배양된 꽃사슴 핵이식 수정란

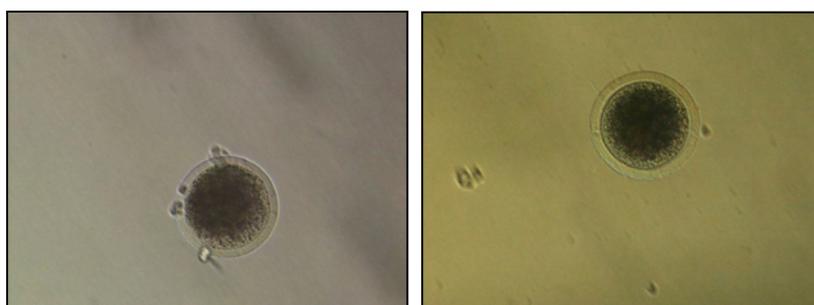
1차 년도에 핵이식(복제) 수정란의 생산 결과는 표 11과 같았다.

표 11. 1차년도(2010년) 핵이식수정란 생산 결과

Species /Breed	ID	No. of oocytes	MII (%)	Enucleated (%)	Fused (%)	Cleaved (%)	Remarks
Elk	123	7	1	1	0	0	Lysed before fusion
Elk	127	11	4	4	1	0	
Sika deer	115	3	2	2	1	0	
Sika deer	117	14	0	0	0	0	
Total		35	7 (20)	7 (100)	2 (29)	0 (0)	

표 11에서 품종별 채란된 난포란을 제외성숙 후 핵이식한 결과 엘크에서 처음으로 세포 융합에 성공하였다. 1차 년도에 핵이식 수정란 생산과정에 대한 고찰은 다음과 같았다.

- ① Collection한 oocyte는 IVM medium에서 24시간 배양하였다.
- ② IVM 성적이 매우 낮았다(20% 수준). MII oocyte도 대체적으로 quality는 낮았다.
- ③ 단순히 IVM의 문제인지, follicular oocyte collection시 너무 작은 follicle <1 mm 까지 회수한 데 기인한 것인지는 분명하지 않았다,
- ④ Oviduct flushing에 의한 in vivo-matured oocyte collection을 고려할 필요가 있었다.
- ⑤ Fusion rate도 매우 낮았다(29%). Oocyte membrane이 매우 약한 특징이 있었다. 1차 fusion에 실패한 4개의 oocyte는 30분 후 다시 fusion을 시도하였으나 lysis(2개) 또는 fusion에 실패하였다(2개).
- ⑥ Maturation이 안된(no 1stpolarbody) oocyte 28개는 추가로 IVM medium에서 4시간 배양하였으나 상태에 변화 없었다. Hoechst 염색 결과 28개 중 13개는 MI nucleus로 추정되는 핵이 관찰되어 enucleation 실시하였으나 enucleation 후 5개는 lysis 되었다. 나머지 8개에 대하여 fusion을 시도하였으나 실패하였다.
- ⑦ 최종적으로 2개의 핵이식 수정란을 배양하였으나 cleavage까지 이르지 못하고 사멸하였다(그림 45).
- ⑧ Hyaluronidase 처리 후 cumulus cell 제거가 불가능한 5개의 COC는 ionomycin과 6-DMAP으로 activation을 실시하였으나, 2일 후 5개 중 1개는 4-cell parthenogenetic embryo로 발달하였으나 사멸하였다(그림 46).



Sika deer NT embryo using dermal fibroblast(좌) Elk NT embryo using antler cells(우)
그림 45. Dermal fibroblast(좌) 및 antler cells(우)로 핵이식된 엘크 복제 수정란



그림 46. Parthenogenetic Embryos in Sika Deer, 2 Days after Activation

표 12. 2차년도(2011년) 핵이식수정란 생산 결과

Species/Breed	ID	회수된 난자	성숙개시 난자	성숙 후 난자	제핵된 난자	핵이식 난자	융합된 난자	분할된 난자
Elk	126	3	2	0				
	129	1	1	0				
	131	5	5	1	1	1	1	
	132	1	1	0				
	소계	10	9	1				
Flower deer	18	12	12	2	1	1	0	
	20	2	2	0				
	24	14	7	0				
	126	7	6	0				
	소계	35	27	2	1	1	1	

2차 년도에는 난자 수송과정에서 다소 문제가 있었다. 채란 후 난포란을 보온병에 담아 운반할 때 보온병의 온도가 45℃ 상태로 운반되어 실험실에 도착하였을 때 이미 대부분의 난자가 세포질이 백색으로 변하고 세포막의 파괴가 관찰되었다. Elk 난자 수송의 경우 채란 후 시간이 많이 경과한 것으로 생각되어 난자의 상태가 다소 부실한 원인이 된 것으로 간주되었다. 2차년도까지는 매년 번식계절 도래 시기에 시험축 대부분을 동기화시켜 한꺼번에 채란하였던 관계로 2차년도의 연구 수행 중 한 순간의 실수에 의해 많은 시험처치가 거의 무의로 끝나게 되었다.

표 13은 꽃사슴의 핵이식란을 생산하기 위해 번식계절 중(10~12월)에 꽃사슴 19두에 대해서 PGF₂α(Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 PG 600(1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 후에 마취 후 수술하여 채란된 난포란을 : TCM-199에 10% FBS (v/v), 0.2 mmol/L sodium pyruvate, 25 mg/mL gentamycin sulfate, 1 mg/mL follicle-stimulating hormone (Stimufol; Merial, Lyon, France), 1 mg/mL estradiol-17b and 0.57 mmol/L cysteine이 함유된 체외성숙 배양액에 옮겨 38.5℃ incubator(at in an atmosphere of 5% CO₂ 95% air)에서 20시간 성숙시킨 후 데미콜신을 30분 동안 처리하여 난구세포를 제거한 후 제핵하고 녹용 세포핵을 융합시켜 융합율과 발생능을 조사한 결과를 나타내었다.

표 13. 3차년도(2012년) 핵이식수정란 생산 결과

No. of COCs	No. of MII(%)	No. of ENoocytes	No. of fused oocytes(%)	No. of cleaved embryos(%)	4-Cell (%)
32	24(75%)	18	16(90.0)	12(75)	6(37.5)

표 13에서 나타낸 바와 같이 핵이 제거된 성숙 난포란의 융합율은 90% 수준이었으며, 융합 후 체외배양된 난자의 배발생율은 핵이식된 수정란 16개 중에서 12개가 발생됨으로써 발생율은 75% 수준으로 향상되었다. 그 중 4-세포기까지 발달한 핵 이식수정란은 6개로 37.5%가 성공하였다(4-세포기 성공률).

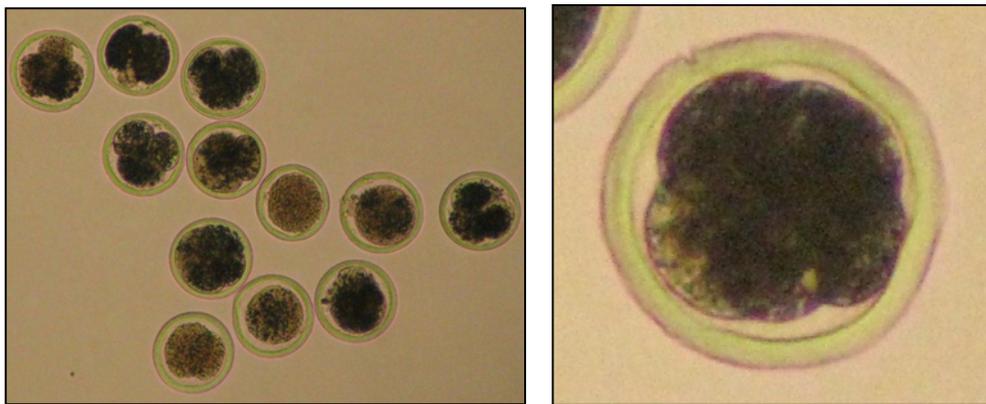


그림 47. 핵이식 후 난할된 복제수정란(Day 2) 및 배양 4일째의 4-세포기 복제 수정란

그림 47은 핵이식(복제) 후 난할된 복제 수정란들이며, 좌측 사진은 정상적인 상태의 4-세포기의 복제 수정란을 보여주고 있다.

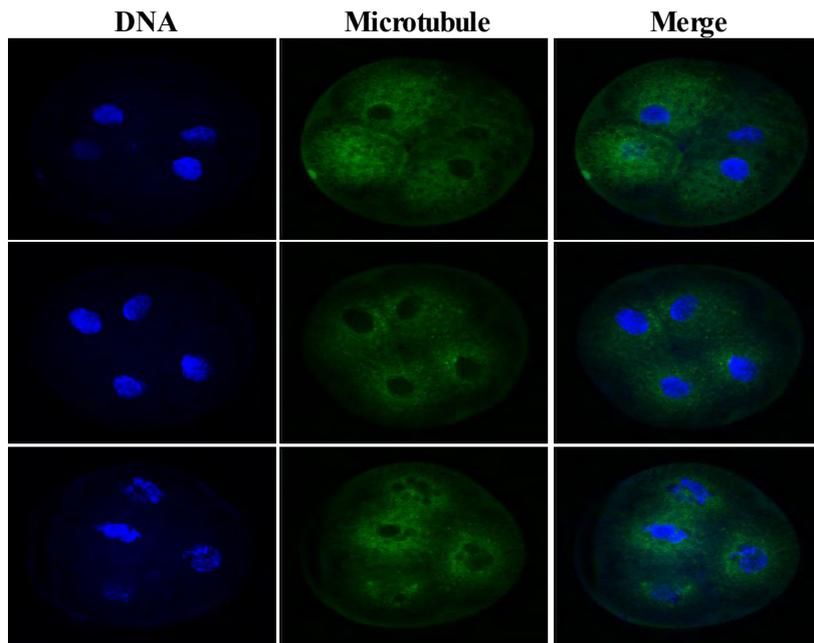


그림 48. 융합 후 4일 동안 배양된 핵이식수정란의 핵 염색 결과

그림 48은 융합 후 4일동안 배양된 핵이식(복제) 수정란들의 크로마틴(염색질)과 미세소관의 분포를 나타낸 것으로 정상적인 발생 상태를 확인할 수 있었다.

표 14는 꽃사슴 핵이식수정란을 생산하기 위한 배양온도가 각각 37 °C 및 38.5°C일 때 융합율과 난할율은 각각 유의적 차이가 없었지만 (90.0% vs 95.2%; 75% vs 75%), 4세포기 배아의 발달율에서는 38.5 C 조건에서 현저하게 높았다(16.7% vs 62.5%). 연구 결과 얻어진 4세포기 복제란은 발정 동기화된 2두의 꽃사슴에게 각각 2개씩 외과적 및 비외과적으로 각각 이식하였다.

표 14.. Developmental rate of NT embryos on the temperature of incubation.

	No. of EN oocytes	No. of fused oocytes (%)	No. of cleaved embryos (%)	4- Cell (%)
37 °C	9	8 (90.0) ^a	6 (75.0) ^a	1 (16.7) ^a
38.5 °C	21	20 (95.2) ^a	16 (75.0) ^a	10 (62.5) ^b

또한 꽃사슴의 핵이식란을 생산하기 위해 번식계절 중(10~12월)에 꽃사슴 19두에 대해서 PGF₂ α(Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 PG 600(1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 후에 마취 후 수술하여 채란된 난포란을 TCM-199에 10% FBS (v/v), 0.2 mmol/L sodium pyruvate, 25 mg/mL gentamycin sulfate, 1 mg/mL follicle-stimulating hormone (Stimufol; Merial, Lyon, France), 1 mg/mL estradiol-17b and 0.57 mmol/L cysteine이 함유된 체외성숙 배양액에 옮겨 38.5°C incubator(at in an atmosphere of 5% CO₂ 95% air)에서 20시간 성숙시킨 후 데미콜신을 30분 동안 처리하여 난구세포를 제거한 후 제핵하고 녹용 세포핵을 융합시켰다. 융합 시 150V-45us-2Plus와 220V-15us-2Plu 조건에서 각각 21개 및 12개를 융합시킨 후 배양액에 옮겨 6일간 배양하여 발생능을 조사한 결과는 표 15와 같았다.

표 15. Developmental rate of NT embryos.

Fusion condition	No. of EN oocytes	No. of fused oocytes (%)	No. of cleaved embryos (%)	4- Cell (%)
150V, 45us, 2plus	21	20 (95.2) ^a	16 (75.0) ^a	10 (62.5) ^a
220V, 15us, 2plus	12	10 (83.3) ^b	8 (80.0) ^a	1 (12.5) ^b

표 15에서 보는바와 같이 꽃사슴 핵이식수정란을 생산하기 위한 융합조건으로 전기자극의 크가 150V-45us-2Plus 일 때가 220V-15us-2Plus일 때보다 융합율이 현저하게 높았고 (95.2% vs 83.3%), 난할율에서는 두 처리 간에 유의적 차이가 없었다(75% vs 80%). 또한 4세포기로의 배아 발달율도 150V-45us-2Plus 조건이 220v, 15us, 2Plus 조건 보다 현저하게 유의적(p<0.05)으로 높았다(62.5% vs 12.5%). 연구 결과 얻어진 양호한 4세포기 복제란은 발정 동기화된 2두의 꽃사슴에게 비외과적(질경법) 및 외과적으로 각각 2개씩 이식하였다.(처음에는 6일까지 배양하였으나 4세포기 이상 발생하지 않아서 융합 후 2일째에 이식하였음) 사슴 복제수정란의 발달에 배양액의 영향인지 4-세포기 block 현상인지 더 규명하지는 못하였다.

3. 사슴 난포란의 체외 수정에 관한 연구 결과

초기 핵이식 수정란 생산의 성공률이 저조하였던 관계로 핵이식 수정란의 발생 성공률을 높이기 위한 배양조건을 구명하기 위해서 체외수정을 일부 실시하였다. 체외성숙이 끝난 꽃사슴 난포란을 수정배양액이 들어 있는 4-well dish에 각각 5개씩 성숙 난포란을 옮긴 후 동결 보존된 꽃사슴 정액을 용해하여 이 등(1995)의 방법에 의한 수정능획득처리(caffeine) 후 각 well 당 정자 농도가 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ cell/ml 되게 주입하고 멸균 파라핀으로 피복한 후 6시간 동안 수정시켰다. 이 때 동결 용해된 정자의 활력은 60% 이상이었다. 수정된 난자를 수정란발생 배양액에 48시간 동안 배양시켜 배 발달을 관찰하였으나 배 발달 또는 분할된 수정란은 관찰되지 않았다(표 16).

표 16. 정자농도에 따른 꽃사슴 난포란의 체외 수정율.

Concentration (Cell numbers/ml)	No. of oocytes maturated	No. of fertilized oocytes (%)	No. of cleaved embryos (%)	4- Cell (%)
1.0×10^6	5	0	0	-
2.0×10^6	6	0	0	-

사슴 난포란의 체외수정이 실패로 끝난 원인은 제한된 난포란의 숫자에 의하여 추가적인 반복 실험을 할 수가 없었기 때문이었다. 왜냐하면 체외수정기술 개발은 본 연구과제에 포함되어 있지 않았으며, 복제 수정란 생산에 동원할 난포란의 수도 매우 귀하게 획득되었기 때문이었다. 사실 난포란 채란을 위한 몰이, 마취 등에서도 사슴 스스로의 긴장과 스트레스에 의해 많은 사슴이 폐사되었기 때문이었다.

제 5 절 핵이식 수정란(복제)의 이식 기술 확립

1. 사슴의 인공수정 기술 확립

가. 직장질법에 의한 예정시각 인공수정기술 확립(엘크)

2010년 사슴 인공수정기술 확립을 위하여 천안 인근 지역 6개 농장 61두에 대해서 인공수정을 실시하였다. 엘크 사슴의 인공수정 기술은 추후 수정란이식 및 복제 수정란이식기술 확립의 기반기술이라고 할 수 있기 때문이었다. 사슴 인공수정은 그림 49와 같이 기본적으로 사전에 암사슴들이 포유중인 자락을 이유시키고, 개체의 건강상태를 점검한 후 개체표식을 한 후 실시하였다. 발정동기화 등의 방법은 기본적으로 다배란 처리와 유사하게 실시하고 인공수정을 직장질법에 의한 비외과적 방법으로 실시하였다.

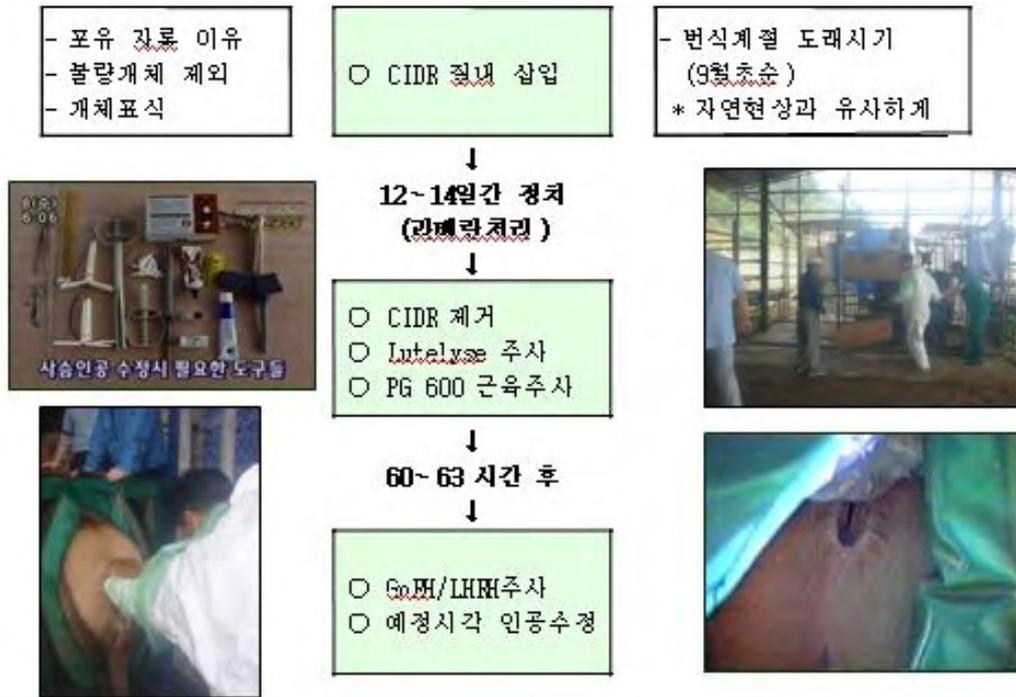


그림 49. 사슴(엘크)의 예정시각 인공수정 방법

직장질법(直腸鑿法, recto-vaginal method)에 의한 인공수정(정액주입)은 엘크와 같이 큰 품종에 있어서 소의 인공수정처럼 왼손을 직장내에 넣고 자궁경을 고정한 후 주입기의 선단을 손의 감촉에 따라 자궁경관내에 밀어넣고 주입기 선단이 자궁경관을 완전히 통과한 후 손가락의 감촉으로 선단부위가 자궁부위에 도달되었을 때 정액을 주입하는 방법이다. 특히 사슴의 경우 자궁경관은 그림 50과 같이 풍선-돌출형으로 주입기 선단이 자궁경관을 통과할 때 돌출된 경관 측벽의 함몰부위에서 크게 저항을 받거나 전진이 어려우므로 주입기의 끝을 바늘로 실을 한 올 한 올 꿰매 듯 상하로 움직이면서 돌출부위의 경관을 하나씩 하나씩 통과시켜 전진시키거나, 직장내로 삽입한 왼손을 사용하여 돌출된 경관을 하나씩 하나씩 구슬 꿰매 듯 주입기에 끼우면서 통과시켜야 정액주입에 성공할 수 있었다.

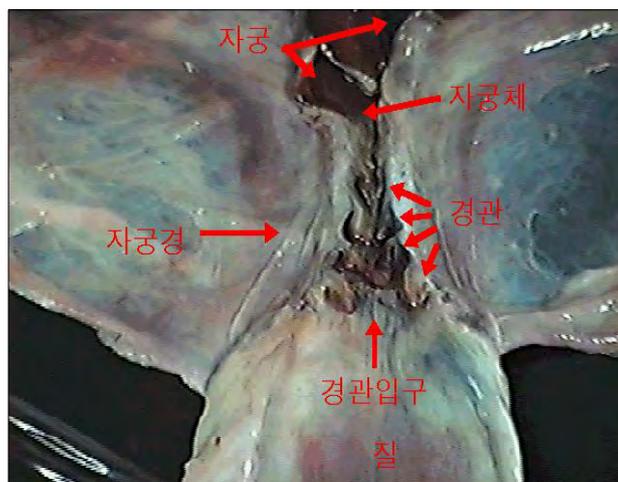


그림 50. 사슴 자궁경관의 해부학적 도해(엘크)

엘크의 경우 직장질법으로 인공수정하는 요령으로 다음과 같이 실시하였다.

- ① 인공수정 할 대상 사슴을 보정틀에 잘 보정한 다음 외음부를 깨끗이 닦고 가볍게 소독한다.
- ② 정액을 준비한다(동결정액의 경우에는 37℃물에 15초간 용해시킨다).
- ③ 정액주입기 선단의 주입봉을 몸체로부터 약간 뒤로 분리하여 선단 내부에 정액이 들어 있는 스트로우(스트로우의 절단부위가 전방을 향하도록)를 삽입하고 주입봉 끝을 스트로우(면봉부분) 후면에 잘 연결하여 결합시킨다.
- ④ 직장에 손을 넣기 위해 비닐장갑을 왼손에 끼고 장갑 표면에 비눗물이나 윤활제 또는 식용유를 바른 후 서서히 삽입하여 직장 후반부에 있는 분(糞)을 바깥으로 배출시킨다.
* 주의사항 : 직장의 수축운동과 복압에 의하여 왼손의 전진이 어려울 경우에는 그 자리에서 가만히 멈추어 복압이 약해지거나 직장 수축운동(파상운동)이 약해지면 다시 왼손을 전진시킨다.
- ⑤ 직장 내 왼손이 골반부위정도까지 도달되면 아래로 촉진하여 골반강의 치골결합부, 자궁경 및 자궁을 확인하면 손가락으로 자궁경관을 슬며시 거머쥔다.
(이때 숙련자는 난소까지도 촉진이 가능하며 배란될 난소쪽과 난포, 난포수 및 황체상태까지도 진단하여 대상 암사슴의 인공수정에 적합 여부도 알 수 있다. 단, 무리한 난소 촉진은 오히려 난소손상으로 인공수정에 실패할 수도 있다.)
- ⑥ 오른손으로는 정액주입기를 외음부내에 삽입하고 주입기 선단이 질을 통과하여 자궁경입구에도달할 수 있도록 주입기를 서서히 주입시킨다.
(특히 주입기 선단이 질 내에 삽입될 때 요도개구부에 삽입되지 않도록 외음부강의 상단부위로 전진시켜 삽입하며 요도개구부와 함께 있는 처녀막 흔적부 앞쪽의 주름져 있는 여러 추벽에 걸리지 않도록 조심한다.)
- ⑦ 질을 통하여 자궁경 입구까지 삽입된 주입기선단을 왼손이 거머쥐고 있는 자궁경입구내로 고리를 끼우듯 유도하여 경관을 통과시킨다.
(주입기를 자궁경관에 잘 통과시키기 위해서는 왼손을 이용하여 주입기 끝이 파상운동 형태의 전진이 되도록 경관을 상하로 약간 움직여서 주입기의 전진을 도와준다.)
- ⑧ 직장 내에 있는 왼손의 검지(둘째손가락)로 자궁경관을 통과한 주입기 선단을 확인한 후 정액을 서서히 자궁내에 주입하고 정액주입기를 서서히 몸 밖으로 꺼낸다.
- ⑨ 정액 주입이 끝난 암사슴의 외음부를 약간 마사지해 준다. 정액 주입기는 다음 주입을 위해 곧 바로 소독해 둔다.

나. 질경법에 의한 인공수정 기술 확립(꽃사슴)

질경법(膺鏡法)은 개체의 크기가 작은 면양이나 산양에서 주로 많이 이용되는 방법으로 질경이나 원통관을 질내에 삽입하고 전등을 이용하여 자궁경관을 확인한 다음 주입기 선단을 자궁경 외구에 삽입하여 주입하는 방법이다(그림 51). 사슴의 경우에는 주로 직장질법으로 인공수정하기 어려운 체격이 작은 꽃사슴에서 이용할 수 있는 방법이다. 이 방법은 자궁경관을 완전히 통과할 수 없을지도 모르기 때문에 정액의 역류를 방지하기 위하여 직경이 가느다란 바룬 카테타(balloon catheter)를 이용하는 것도 좋은 방법이 될 수 있었다.



그림 51. 질경법에 의한 꽃사슴 인공수정

2. 사슴의 수정란이식 기술 확립

가. 사슴의 비외과적 수정란이식 기술(직장질법)

(1) 직장질법 수정란이식

과배란 처리하고 인공수정 후 7일째 공란룩 꽃사슴 1두로부터 수정란을 회수한 결과 5개의 수정란을 회수하였으며, 발정동기화 된 수란룩(꽃사슴 2두)에 각각 2개 및 3개를 비외과적으로 이식하였다.(그림 52).

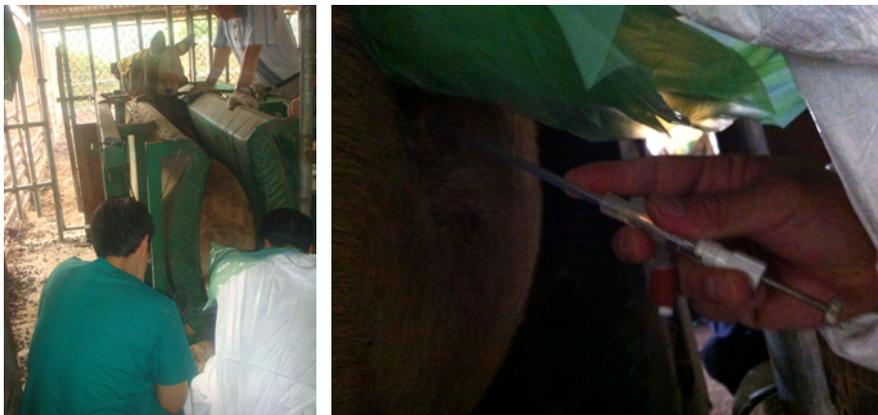


그림 52. 엘크에 있어서 비외과적 수정란 이식(직장질법)

(2) 질경법 수정란이식

질경법에 의한 수정란이식 방법은 그림 53과 같이 먼저 마취된 사슴의 후구올 높여서 시술자가 자궁경관을 용이하게 관찰 할 수 있도록 하였다. 경관 관찰이 잘 될 수 있도록 보조자가 질 내부로 빛을 비추어 주었다.



그림 53. 꽃사슴 수정란의 비외과적 이식(결정법)

나. 사슴의 외과적 수정란이식 기술(수술)

외과적으로 사슴 수정란을 이식하기 위해서는 먼저 이식할 상실배 이상의 수정란을 2개씩 0.25ml 스트로우에 장진하여 준비한 다음(그림 54) 마취 후 수술에 의해 절개 및 적출된 자궁의 선단부에 18G blunt needle로 자궁 내부로 편치(구멍)을 낸 후 준비된 수정란 스트로우를 주사기 선단의 연결관에 연결시키고 미리 구멍을 낸 자궁 선단부에 수정란이 들어있는 스트로우를 삽입하여 수정란을 주입하였다(그림 55).

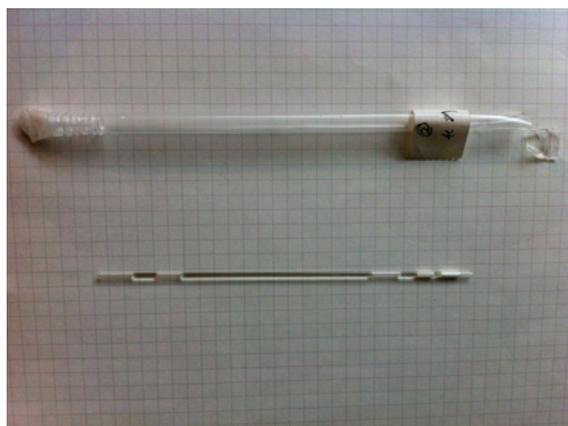


그림 54. 주입된 수정란의 스트로우 내 장진(준비)



자궁 선단 천공(좌) 및 복제 수정란 주입(우)
그림 55. 자궁 선단 내 수정란의 이식(주입)

3. 사슴의 복제 수정란이식 기술 확립

가. 복제 수정란의 외과적 이식

생산된 꽃사슴 복제수정란은 발정동기화 처리 후 4일째인 수란록인 꽃사슴의 난관에 그림 56과 같이 이식하였다. 꽃사슴 복제 수정란은 융합 후 2일째의 4-세포기 단계에서 마리당 2개의 복제 수정란이 이식되었다.



그림 56. 난관에 4-세포기 수정란의 이식(주입)

나. 복제 수정란의 비외과적(질경법) 이식

생산된 꽃사슴 복제 수정란은 외과적으로 이식하기 전 먼저 비외과적인 질경법으로 이식하였다. 외과적 방법과 마찬가지로 발정동기화 처리 후 4일째인 수란록인 꽃사슴의 질 내의 자궁근경관 내에 그림 57과 같이 복제 수정란의 상태(갯수)를 확인하고 그림 58과 같이 이식하였다. 마찬가지로 꽃사슴 복제 수정란은 융합 후 2일째의 4-세포기 단계에서 마리당 2개의 복제 수정란을 자궁 선단에 이식하였다.



그림 57. 꽃사슴 복제 수정란의 주입 전 준비 및 검사



그림 58. 복제 수정란의 장전 및 비외과적 주입(이식)

4. 사슴의 임신진단기술 확립

엘크의 경우에는 차기 발정예정일에 발정여부를 관찰하고 수정 후 40~60일령에 직장검사와 초음파진단기(Sonoace 1500, USA)를 이용하여 임신여부를 진단하였다. 임신 초기에는 인공수정 후 임신 40일경에 직장검사법으로 자궁의 크기, 자궁의 파동감, 난소에 황체 존재 등을 측정하여 임신여부를 확인하였으며, 초음파진단은 Morrow 등(1994)의 임신진단법에 따라 6.5MHz 또는 5.0MHz rectal probe가 장착된 초음파진단기(Sonoace 1500, USA)를 이용하여 임신 60일 전후에 진단을 실시하였다.(그림 59)

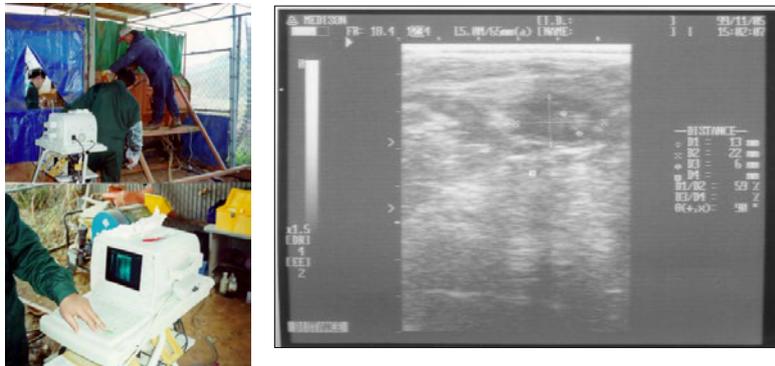


그림 59. 엘크에 있어서 초음파진단기에 의한 조기 임신 진단

임신된 엘크의 경우 임신 60일령에 태아의 크기는 23×28mm 정도였다. 그러나 본 실험의 수정란 및 복제수정란 이식 후에는 수태 성공률을 향상시키기 위하여 임신진단을 실시하지 않았다.

5. 결과

가. 사슴 인공수정의 결과

(1) 참여 농가별 인공수정 및 수정란이식에 대한 수태율과 분만율

2010년 인공수정기술 확립을 위하여 천안 인근 지역 6개 농장 61두에 대해 인공수정을 실시한 결과 수태율은 표 17과 같았다.

표 17. 농가별 시험(수정) 두수와 인공수정 후 수태율

농장명 (기관)	인공수정 시술두수	합사 여부	수태율		
			카마파열 두수 (승가 확인)	수태 두수	수태율(%)
운봉산 사슴농장	9	합사	2	7	66.7
거록원	5	합사	1	4	80.0
한록원	19	합사	3	16	84.3
무릉원	13	자체합사	6	7	53.9
청송사슴농장	4	합사	1	3	66.6
송암사슴농장	11	자체합사	3	8	72.8
계	61		16	45(73.8)	70.7

표 17에 나타난 바와 같이 인공수정 후 카마(KAMAR)를 부착하고 수정 후 18~24일째에 종 룩과 합사하여 부착된 카마의 파열 여부로 수태 확인한 결과 전체 처리 두수에 대한 수태율은 70.7%였다. 참여 농가들의 분만 확인이 제대로 이루어지지 않아 정확한 분만율은 조사되지 못하였으나 방문 및 구두조사(전화 확인)에 의하면 약 30% 정도의 분만율을 얻은 것으로 나타났다.

(2) 발정 및 배란 동기화 방법이 수태율에 미치는 영향

표 18. 엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란 동기화 방법이 수태율에 미치는 영향

Treatment method	No. of treatment	No. of ruptured KAMAR	Conception rate(%)
PG600 + PGF _{2α}	10	1	90.0
PG600 + FSH	10	2(1)	80.0
PG600	12	6(3)	50.0

* ()의 수는 탈락된 KAMAR의 수(數) 임.

CIDR를 질 내에 삽입하여 14일 동안 정치 시킨 후 제거 하고 발정유도처리 방법으로

PG600, PG600+FSH 또는 PG 600+PGF_{2α}를 주사하고 62~64시간 후에 인공수정한 결과 수태율은 PG 600+PGF_{2α}처리가 90.0%로 가장 높았다. 이 때 수태율은 인공수정 시 카마(KAMAR)를 부착하고 수정 후 18~24일째에 종록과 합사하여 부착된 카마의 파열 여부로 수태율을 확인하였다(카마 파열 : 재발정으로 미수태된 것으로 판정).

나. 사슴 수정란 및 핵이식수정란 이식 결과

(1) 과배란 처리 후 품종별 수정란 회수율

표 19. 사슴의 과배란 처리 및 인공수정 후 수정란 회수율

종류 (품종)	다배란 처리				비고
	두수	평균 배란 수	평균 회수된 수정란 수	회수율(%)	
꽃사슴	6	6.7	4.7	70.2	
엘크	4	5.3	4.5	84.9	

본 처리방법에 의해 꽃사슴 및 엘크의 회수된 평균 수정란 수(회수율)는 각각 4.7(70.2%) 및 4.5(84.9%)개 였다.

(2) 사슴 수정란이식 결과

2010년 10월 10일에 수정란을 이식한 엘크로부터 1두의 자록을 생산하였으며(그림 60), 자록의 성별은 수컷이었다.

본 연구에서 태어난 엘크 자록의 임신기간은 244일 이었다.



그림 60. 비외과적 수정란이식으로 태어난 엘크 자록(2011. 6. 12일 확인)

꽃사슴의 경우에도 2010년 10월 10일 비외과적으로 이식된 2두의 어미로부터 1두의 어미에서 분만이 이루어졌으나 난산에 의하여 분만이 자록 생산에는 실패하였다(그림 61).



그림 61. 비외과적 수정란이식으로 태어난 꽃사슴 자록(2011. 5. 28일 확인)

꽃사슴의 경우 2010년에 수정란 이식한 개체가 난산에 의하여 어미가 폐사하여 성공하지 못하였다. 이때의 임신기간은 228일이었다. 꽃사슴의 난산 원인은 과도한 스트레스가 중요한 요인으로 작용한 것으로 사료되었으며, 수정란이식에 의한 거대 태아(산자)도 그 원인 중의 하나로 판단되었다.

(3) 품종별 사슴 수정란이식 결과

표 20. 품종별 사슴 수정란이식 결과

종류 (품종)	수정란 이식					비고
	두수	두당 이식 수정란 수	재발 확인 두수	수태율 (%)	분 만 두수(%)	
꽃사슴	2	2	-	100.0	1(50.0)	분만 시 사산 됨
엘크	3	2	-	100.0	1(33.3)	정상분만 됨

본 처리방법에 수정란 이식 결과 재발 확인에 의한 수태율은 꽃사슴 및 엘크 모두 100.0% 였으나 분만은 꽃사슴의 경우 2두 수정란이식에서 1두가 분만하였으나 어미가 분만 시 폐사 함으로써 자록 생산에는 실패하였고(분만율 50.0%), 엘크는 3두 수정란 이식에서 1두가 정상 분만으로 성공하여 33.3%의 분만율을 나타내었다.

(4) 사슴 복제 수정란(꽃사슴)의 이식 결과

(가) 외과적 사슴 복제 수정란의 이식 방법 및 결과

꽃사슴 복제 수정란의 외과적 이식은 수정란이식 시 외과적 처리 방법에 준하여 실시하였다.

먼저 생산된 4-세포기 수정란을 0,25ml 스트로우에 2개씩 그림62와 같이 포장 및 장전하였다. 수정란이 포장된 스트로우를 1.0ml의 일회용 주사기에 고무튜브로 연결시켜 외과적으로 자궁을 적출시킨 후 자궁 선단 부위에 복제 수정란 2개씩 2마리에게 각각 이식시켰다(그림 63).



그림 62. 꽃사슴 복제 수정란의 준비(장전)



자궁 선단 천공(좌) 및 복제 수정란 주입(우)

그림 63. 자궁 선단 내 복제 수정란의 이식(주입)

복제 수정란이 외과적으로 이식된 꽃사슴 2두는 현재 정상적으로 사육(건강상태 양호)되고 있으나 임신에 따른 복부 팽만 상태로 보아 수태에는 실패된 것으로 추정되었으며, 최종 보고서 제출 시점까지 분만되지 않은 상태이기 때문에 산자 생산에는 실패한 것으로 판단되었다.

(나) 비외과적 사슴 복제 수정란의 이식 방법 및 결과

꽃사슴 복제 수정란의 비외과적 이식도 앞선 설명의 비외과적 수정란이식 방법에 준하여 실시하였다. 비외과적 수정란이식기구는 그림 64와 같았다.



(질경, 렌턴, 자궁경관 확장 봉, 주입기, 시스)

그림 64. 비외과적 복제 수정란의 이식 기구

꽃사슴 복제수정란을 비외과적으로 이식할 경우에는 수정란 이식 방법에 준하여 실시하되, 먼저 그림 65와 같이 복제 수정란의 스트로우 내의 위치와 수량을 확인한 다음 0,25ml 수정란 주입기에 복제 수정란을 장전하고 질경법으로 이식하였다(그림 66).

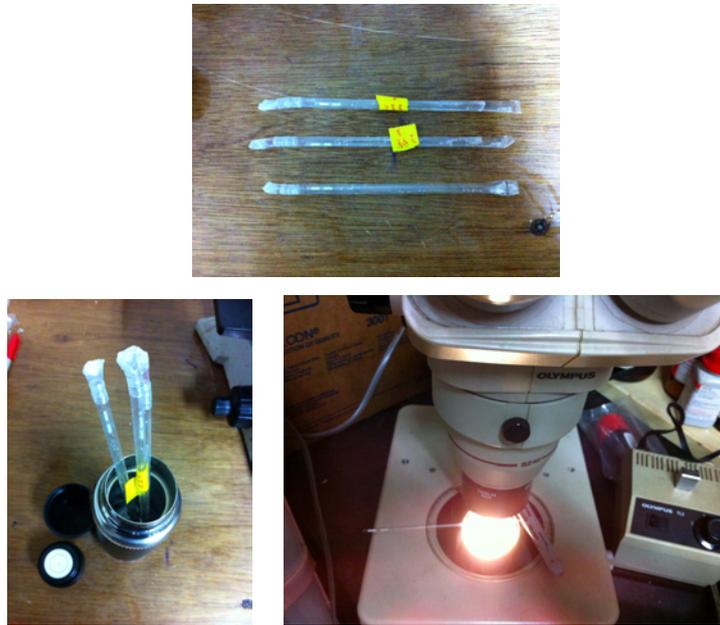


그림 65. 복제 수정란의 주입 전 준비 및 검사



그림 66. 복제 수정란의 장전 및 비외과적 주입(이식)

꽃사슴 복제 수정란의 비외과적 이식도 외과적 이식과 마찬가지로 2012년 12월 15일에 4-세 포기 복제수정란을 2개씩 각각 이식하였다. 분만예정일(임신기간 230일 기준)은 2013년 8월 1일이지만 현재까지 임신 기미는 알아낼 수가 없었다. 임신을 조기에 알아낼 수도 있으나 임신 진단을 위해서는 마취 보정 등에 의한 처치는 분만 가능성이 더욱 낮아지기 때문에 임신 진단 시술은 하지 않았다. 다만 복제 수정란의 외과적 및 비외과적 이식 시기가 흑한의 날씨(눈보라/폭풍)인 관계로 시술이 매우 힘든 상태였다. 현재 복제 수정란의 이식 후 임신 여부는 확인하지 못하였으며 분만을 기대하고 있는 중이다. 복제 수정란이 비외과적으로 이식된 꽃사슴 2두도 현재 정상적으로 사육(건강상태 양호)되고 있으나 임신에 따른 복부 팽만 상태로 보아 분만에는 실패할 것으로 추정되었으며, 최종 보고서 제출 시점까지 분만되지 않은 상태이기 때문

에 산자 생산에는 실패한 것으로 판단되었다.



< 2012. 12. 15일 이식 작업 >

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

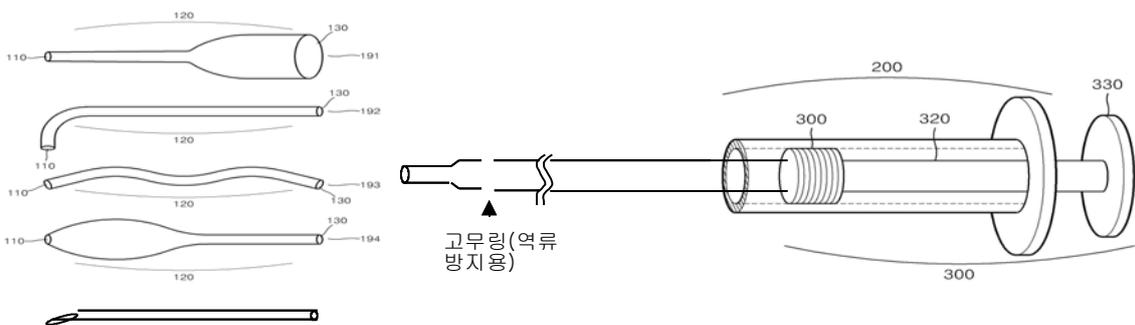
제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도

1. 1차년도의 연구개발 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발	우수 사슴의 녹용 세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발	100	○ 품종별 종록의 기본 사양을 통한 녹용세포 수집 및 배양 - 우수 종록(엘크 및 꽃사슴 각 3두) 및 시험축 확보, 특정 세포 추출
			100	○ 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 수정란 이식 기초기술 확립 - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 수정란 이식(인공수정기술 확립)
	녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산	사슴의 녹용세포 수집 및 특성 구명	100	○ 우수 종록으로부터 특정 조직 세포 확보 - 주관연구기관의 사슴 핵이식 복제를 위하여 사용될 수 있는 공여세포를 확보함. - 녹용생산이 우수한 종록으로 등록된 엘크 사슴의 귀 조직을 채취하여 세포 분리 및 배양 증식함.
			100	○ 녹용세포의 효율적인 분리 및 회수 - Percoll의 밀도차를 이용한 원심분리 세포 회수 - 세포외기질물질 등을 이용한 세포분리법의 효율 검증
		90	○ 분리된 세포의 형태학적 특징과 기능적 활성화도 분석 - 녹용의 부위별로 채취된 세포들이 형태학적 특징 검증. - 녹용의 부위별로 채취된 세포들의 체외 배양여부와 증식정도에 따른 활성화도 분석.	

2. 2차년도의 연구개발 목표 및 달성도

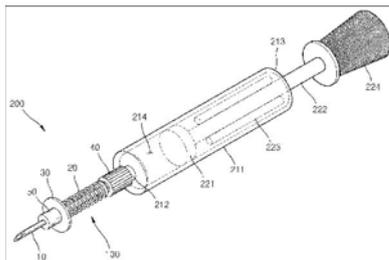
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발	우수 사슴의 녹용 세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발	100	○ 품종별 종록의 기본 사양을 통한 녹용세포 수집 - 우수 종록(엘크 및 꽃사슴 각 3두) 및 시험축 관리, 특정 세포 추출
			90	○ 우수 종록 정액의 효율적 동결보존 기법 개발 - 효율적인 보조기술 개발을 위하여 glycerol, DMSO, ethylene glycol, sucrose 등과 같은 동해보호제의 농도별 단일 혹은 병합 처리 효과 조사
			100	○ 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 수정란 이식 기초기술 확립 - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 수정란 이식
			100	○ 사슴의 다배란/발정동기화에 의한 미성숙 난포란 채란 및 핵이식 수정란 생산기술 확립 - 다배란 및 발정동기화방법을 급여식으로 비교 - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 핵이식 수정란 생산 ○ 시작품 제작 및 출원 - 탄성부재를 이용한 액체주입장치(특허출원) (2011.01.11출원)
	녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산	녹용세포의 체외 배양/증식을 위하여 다양한 배양 조건의 효율 검증을 통한 최적의 배양 시스템 확립	100	○ 녹용세포의 체외배양을 위한 다양한 배양액의 녹용세포 증식 효과 검증 ○ 녹용세포의 증식 촉진 방법 (특허출원 : 10-2012-0056109) (2012. 5. 25)
			100	○ 배양액내 혈청 및 첨가농도 효과 검증
			100	○ 배양기내 온도 및 산소가스 농도 효과 검증
			100	○ 다양한 성장인자의 처리에 따른 녹용세포의 증식 효과 검증
			100	○ 녹용세포의 효율적인 동결보존 기법 개발



<특허명 : 탄성부재를 이용한 액체주입장치(범용 정액 주입기) 도면>

3. 3차년도의 연구개발 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3 연도 (2012)	우수 사슴의 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 및 이식기술 개발	○ 특허출원 - 채란 및 이식을 위한 무선 화상 전달 내시경 시스템 제작 및 <u>미생물(기탁) 특허출원</u> (사슴 수정란 및 체외배양 녹용세포 등) - 2건	100	○ 녹용 및 육경세포를 이용한 핵이식 수정란의 이식 - 난포란의 체외성숙기술 확립, 미세조작기를 이용한 제핵 및 핵이식 수정란 이식 기술 확립
			80	○ 특허출원 - 채란 및 이식을 위한 무선 화상 전달 화이버 내시경(fiber endoscopy)시스템(출원 못함) - <u>미생물(기탁) 특허출원</u> : 사슴 수정란 및 체외배양 녹용세포 (미실시 사유 : 개체 증명체계 미수립-혈통)
			100	○ 난포란 채란 및 복제 수정란 이식 기술 확립 - 2품종 각 4두로부터 난포란 채란 및 복제 수정란 생산 및 이식 - 수정란이식 자육 생산(엘크 1두, 꽃사슴 1두)
			150	○ 시작품 제작 및 특허 등록 - 탄성부재를 이용한 액체주입장치(특허등록)(제 1263914 호, 2013.05.07등록) - 채란 및 이식을 위한 무선 화상 전달 화이버 내시경(fiber endoscopy)시스템 제작(시작품 제작 - 본문 내에 소개) - Method for the assessment of a semen quality and kit for the same(국제특허출원)(중국 201210083488.X, 2012. 3. 27)
	녹용의 세포배양기법을 통한 생리활성물질의 탐색과 생산	○ 녹용 및 육경세포의 체외 배양을 통한 생리활성물질 검색 및 생산	100	- 녹용세포로부터 생산되어지는 물질의 생리 활성 검증을 위하여 다양한 조직 특이 세포주를 확립(동결보존 및 분양)
			100	- 녹용세포의 배양중 회수되어지는 배양액내 활성물질 스크리닝
			100	- 녹용세포의 배양중 회수된 배양액을 이용하여 조직특이세포의 성장 및 활성도 검증
			100	○ 녹용세포의 체외배양을 위한 다양한 배양액의 녹용세포 증식 효과 검증 - 정액품질 개선에 반영 ○ 시작품 제작 및 출원 - 탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기(특허출원 : 10-2013-0069974, 2013. 6.18)



<특허출원명 : 탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기(2013. 6. 18 출원)>

제 2 절 관련분야의 기술발전의 기여도

1. 논문 발표 : 2 편 (SCI급 1편 / 비SCI급 1편)

Lee Jang-Hee, Baek Soon-Hwa, Lee Joo-Hyung , Ryu Beom-Yong , Kim Ki-Jung, Kim Yong-Hee, Park Seong-Jae, Huh Tae-Yeong, Jeong Yeong-Hoon, Shim Ho-Sup. 2011. Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk. The 11th International Symposium on Developmental Biotechnology "Recent Trends in Reproductive Biotechnology". Supl. p. 33-34.

Kim Ki-Jung, Yoo Hyung-Duk, Kim Youn-Hee, Lee Yong-An, Kin Bang-Jin, Jung Mi-Seon, Kang Hyun-Gu, Lee Jang-Hee, Ryu Buom-Yong. 2014. Enhancement of In Vitro Culture Efficiency of Mesenchymal Stem Cell Derived from Deer Antlers. Tissue Eng. Regen. Med., 11(1) : XXX-XXX.

Tissue Engineering and Regenerative Medicine

<small>Editorial Office: Dept of Ajou University School of Medicine, San6, Woncheon-dong, Younggong-gu, Suwon, Gyeonggi-do, Korea Tel: +82-01-898-8201 Fax: +82-02-744-3402 E-mail: kterms@gmail.com Online submission : http://kterms.or.kr</small>		<small>KTERMS Office Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society 199-1 Donggung-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-816, Korea E-Mail: kterms@kterm.or.kr Homepage: www.kterms.or.kr</small>
--	---	--

Certificate of Publication Acceptance for Paper

Thank you for submitting your paper to "Tissue Engineering and Regenerative Medicine". We notice the publication of paper was decided as follows through our academy's prescribed screening process. For reference, this paper will be posted on February 1, 2014.

Authors : Ki-Jung Kim, Hyung-Duk Yoo, Yong-Hee Kim, Yong-An Lee, Bang-Jin Kim, Mi Seon Jung, Hyun-Gu Kang, Jang-Hee Lee, Buom-Yong Ryu

Paper Title : Enhancement of *in vitro* Culture Efficiency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Deer Antlers

Publication Volume Number : Tissue Eng. Regen. Med., 11(1), page XX (2014)

25, July, 2013

Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Editor in Chief, Professor Byoung-Hyun Min



<논문 게재 예정 증명서 >

2. 특허 : 5건(출원 4건, 등록 1건, 상표등록 1건)

번호	구분	지적재산권명	출원·등록번호 (년월일)	보유자	비고
	상표 등록	스팸조아 (출원번호 2010-0057841)	제 40-0911019호 (2012. 03. 19 등록)	바이오컬처(주)	등록
	실용신안	탄성 부재를 포함하는 액체 주입 장치	제 1263914 호 (2013.05.07등록)	바이오컬처(주)	등록
	국제 출원	Method and kit for semen diagnosis through color changes in methylene blue and semen quality evaluation using same	13123202 (2011. 4. 7)	BIOCULTURE Inc.	출원 (미국)
	국제 출원	Method for the assessment of a semen quality and kit for the same	201210083488.X (2012. 3. 27)	바이오컬처(주)	출원 (중국)
	특허	녹용세포의 증식 촉진 방법	10-2012-0056109 (2012. 5. 25)	바이오컬처(주) <small>류범용, 이장희, 김기중, 김용희</small>	출원
	특허	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기	10-2013-0069974 (2013. 6.18)	공주대산협단, 바이오컬처(주)	출원

3. 학술발표 : 15편

1. Phenol Red를 이용한 돼지 정액의 주입 전 간편 품질 평가 액상정액 개발. 2010. 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 박달영, 광노일, 서동철, 정대영. *Reprod Dev Biol.*, 34(2): 20-21.
2. 엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향. 2010. 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 광노일, 이후일, 서동철, 정대영, 김관국, 김범호, 박성재, 허태영. *The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology.* p. 107.
3. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. 2010. 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. *The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology.* p. 96.
4. Phenol Red의 색상변화를 이용한 주입 전 간편 품질 평가 돼지 액상정액의 개발. 2011. 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 박달영, 광노일, 서동철, 정대영. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 58.
5. 엘크 사슴에 있어서 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향. 2011. 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 이후일, 서동철, 정대영, 김범호, 박성재. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 59.
6. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. 2011. 이장희¹⁾, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 60.
7. U-기반 실시간 바이오 센싱을 이용한 동물 번식관리 시스템 개발. 2011. 이장희, 백순화, 이주형, 황동국, 박지영, 이우람, 연승호. *Reprod Dev Biol.*, 35(2) : 84.
8. 사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발. 2011. 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 김기중, 김용희, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. *Reprod Dev Biol.*, 35(2) : 44.
9. 녹용세포의 효율적인 체외배양시스템 개발에 관한 연구. 2012. 김기중¹, 이용안¹, 김방진¹, 김용희¹, 하승정¹, 이주형², 이장희², 류범용^{1,*} *한국수정란이식학회지.* 29(supl.) : 32.
10. 녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발. 2012. 김기중¹, 이용안¹, 김방진¹, 김용희¹, 정미선¹,

- 이주형², 이장희², 류범용^{1,*} 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 33. - 베스트 포스트상 수상
11. 사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향. 2012. 이장희¹⁾, 백순화²⁾, 이주형¹⁾, 류범용³⁾, 박성재⁴⁾, 허태영⁴⁾, 정영훈⁴⁾, 심호섭⁵⁾. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 63.
 12. 사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향. 2012. 이장희¹⁾, 백순화²⁾, 이주형, 김기중³⁾, 류범용³⁾, 박성재⁴⁾, 허태영⁴⁾, 심호섭⁵⁾, 이종완⁶⁾, The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 104. (2012. 10. 25~26. 제주국제컨벤션센터)
 13. 꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향. 2013. 이장희, 백순화, 이주형. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 69. (단국대. 2013. 5. 24)
 14. 꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향. 2013. 이장희, 백순화, 이주형, 허영남, 김남형. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 70. (단국대. 2013. 5. 24)
 15. 동해보호계가 산양 및 무플런 정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향. 2013. 이장희, 백순화, 이주형. 한국동물번식학회지. 37supl.2) : 52. (건국대. 충주캠퍼스. 2013. 6. 20~21)

4. 박람회(전시회) 출전 : 3회

- 2010년 6월 17 ~ 19일 생명산업 DNA전(장소 : 서울 코엑스)
- 2010년 10월 20 ~ 23일 충남농업기술박람회(장소 : 충남 예산 농업기술원)
- 2010년 12월 2 ~ 5일 서울국제발명대회(장소 : 서울 코엑스)
- * 간편 정액 품질 진단 키트(금상 수상 함).
- 2012년 9월 20 ~ 22일 2012년 생명산업과학기술 대전(장소 : aT 센터)
- * 농업과학기술대상(농림수산식품부 장관상) 수상 함.



<생명산업 DNA전 출전 : 코엑스>



<충남농업박람회 : 예산 충남농업기술원>



<서울 국제 발명대회 : 서울 코엑스(금상 수상)>



<2012년 생명산업과학기술대전 : 서울 코엑스>

5. 박람회(전시회) 참관 : 3회

- 2010. 06. 29 - 07.02 : 2010년 일본 국제바이오박람회 참관
- 2011. 07. 21 - 07.24 : 중국 상하이 국제전자산업 엑스포 참관
- 2011년 RFID/USN 국제전시회 및 컨퍼런스 참관. 서울 코엑스(11. 17)



< 2010년 일본 국제바이오박람회(좌) 및 2011년 중국 상하이 국제전자산업 엑스포 참관(우) >

<수상실적>

1. 2010. 12.05. Seoul Inetrnational Invention Fair 2010. Gold Preze(금상)
The Daignosis Method Of Semen Using Methylene Blue
Solution And The Daignostic Kit For The Quality Of
Semen Using Thereof. (Korea Invention Promotion Association)
2. 2010. 12.05. Seoul Inetrnational Invention Fair 2010. Silve Preze(은상)
Long Term Preservation Method Of Original Form Of
Garden Balsam Through Vacuum Treatment After Rapid
Freeze-Drying. (Korea Invention Promotion Association.
한국발명진흥협회)
3. 2011. 9. 17 표창장 (천안시장 제 19067호) -독서생활화로 다독자로 선정 됨.
4. 2012. 5. 25 Best Poster Award 수상 (2012년 한국수정란이식학회 춘계학술대회)
5. 2012. 9. 20 제15회 농업과학기술대상 장관 표창장 수상



<2012년 발표 : Best Poster Award 수상(2012. 5. 25)/ 장관 표창장 수상(2012년) >

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구성과 목표 대비 성과(달성)

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타 (홍보)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1							1	
	달성	1							1	
2차년도	목표	1	1						1	
	달성	1	1						1	
3차년도	목표	2								
	달성	2								
계	목표	4	1						2	
	달성	4	1						2	3

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

2. 연구 성과 실적

가. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk.	이장희		백순화	Reproductive Biotechnology	Supl. p. 33-34	국내	비 SCI
2014 (예정)	Enhancement of In Vitro Culture Efficiency of Mesenchymal Stem Cell Derived from Deer Antlers.	김기중	류범용	이장희	Tissue Eng. Regen. Med.,	11(1) : XX	국외	SCI

나. 학술발표 성과

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Phenol Red를 이용한 돼지 정액의 주입 전 간편 품질 평가 액상정액 개발	이장희,		백순화	Reprod Dev Biol.,	34(2): 20-21.	국내	
2010	엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란 동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향	이장희		백순화	The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted	Reproductive Biotechnology. p. 107.		
2010	사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향	이장희		백순화	The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted	Reproductive Biotechnology. p. 96.		
2011 년	Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk	Jang-Hee Lee	Soon-Hwa Baek	Joo-Hyung Lee	The 11th International Symposium on Developmental Biotechnology	Supl.p : 33-34.	국제	
2011 년	Phenol Red의 색상변화를 이용한 주입 전 간편 품질 평가 돼지 액상정액의 개발.	이장희	백순화	이주형	한국수정란이식학회지	26 : 58	국내	포스트
2011 년	<i>Eradication of Undifferentiated Spermatogonia and Germline Modification Using Lentiviral Vector in the Pre-Pubertal Bull Testis</i>	김기중 등		류범용	44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction	2011년 7월 31일-8월 4일, Oregon Convention Center Portland, Oregon	국외(국제)	포스터
2011 년	<i>Stage-specific embryonic antigen-1 is a specific surface marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal boar testis</i>	김용희 등		류범용	44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction	2011년 7월 31일-8월 4일, Oregon Convention Center Portland,	국외	포스터
2011 년	엘크 사슴에 있어서 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향	이장희		이주형	한국수정란이식학회지.	26(supl.) : 59.	국내	포스트
2011 년	사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발.	이장희,		백순화, 이주형, 류범용, 박성영, 허영훈, 심호섭.	Reprod Dev Biol	35(2): 44.	국내	포스트

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012 년	녹용세포의 효율적인 체외배양시스템 개발에 관한 연구	김기중	류범용	이용안, 김용정, 이방희, 하승희, 이장희, 이주희	한국수정란이식학회지.	29(supl.): 32.	국내	포스트 (Best Poster Award 수상)
2012 년	녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발	김기중	류범용	이용안, 김용정, 이방희, 하승희, 이주희, 이창희	한국수정란이식학회지	29(supl.) : 33.	국내	포스트
2012년	사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향	이장희		백순화, 류범용, 박성영, 태영호, 이주희	한국수정란이식학회지.	29(supl.): 63.	국내	포스트
2012	사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향	이장희		백순화	The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology	Supl. p. 104.	(제주국제컨벤션센터)	(2012. 10. 25~26.)
2013	꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향.	이장희		백순화	한국수정란이식학회지.	29(supl.) : 69.		(단국대. 2013. 5. 24)
2013	꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조각이 핵이식 후 발생에 미치는 영향	이장희		백순화	한국수정란이식학회지	29(supl.) : 70.		"

다. 특허 출원/등록 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
(2011. 4. 7)	Method and kit for semen diagnosis through color changes in methylene blue and semen quality evaluation using same	BIOCULTURE Inc.	미국	13123202	2013.05.07	탄성 부재를 포함하는 액체 주입 장치	바이오컬처(주)	대한민국	제 1263914 호
(2012. 3. 27)	Method for the assessment of a semen quality and kit for the same	바이오컬처(주)	중국	1210083488.X	2012.03. 19	스핀조아	바이오컬처(주)	대한민국	상표등록 제 40-0911019 호
(2012. 5. 25)	녹용세포의 증식 촉진 방법	중앙대 산협단 바이오컬처(주)	대한민국	10-2012-0056109					
(2013. 6.18)	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 포함하는 약물 주사기	공주대 산협단 바이오컬처(주)	대한민국	10-2013-0069974					

3. 홍보 실적(박람회/전시회 및 학술대회 참가)

가. 박람회(전시회) 출전 : 3회

- 2010년 10월 20 ~ 23일 충남농업기술박람회(장소 : 충남 예산 농업기술원)
- 2010년 12월 2 ~ 5일 서울국제발명대회(장소 : 서울 코엑스)
- 2012년 9월 17 ~ 19일 농업과학기술대전(장소 : 서울 코엑스)

나. 박람회 참관 : 3회

(1) 일본 박람회 참관 내용

- 박람회 명 : 2010년 일본 국제바이오박람회
- 참가 목적 : 바이오센싱 분야 자료 수집
- 참가 기간 : 2010. 06.29 ~ 07.02

(2) 중국 박람회 참관

- 박람회 명 : 2011년 상하이 국제전자산업 엑스포
- 참가 목적 : 바이오센싱 분야 자료 수집
- 참가기간 : 2011. 07. 21 ~ 07. 28

(3) 국내 RFID/USN 국제전시회 및 컨퍼런스 참관(코엑스)

다. 학술대회 참가 : 3회

(1) 한국동물번식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2013년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P027, P079)
- 참가 기간 : 2013. 06.20 ~ 06.21
- 장소 : 건국대학교 글로벌 캠퍼스, 컨벤션 센터

(2) 한국수정란이식학회

- 학술대회명 : 2013년 한국수정란이식학회 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P-41, P-42)
- 참가 기간 : 2013. 05.24
- 장소 : 단국대학교(천안캠퍼스) 제3과학관 국제회의장
- 학술대회명 : 2012년 한국수정란이식학회 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 3편(P-10, P-11, P-41)
- 참가 기간 : 2012. 05.25
- 장소 : 경상대학교 농업생명과학연구원

(3) 국제 발생공학 심포지움

- 학술대회명 : 12차 국제 발생공학 심포지움
- 참가 목적 : 포스트 발표 1편(P-8)
- 참가 기간 : 2012. 10. 25 ~ 26
- 장소 : 서귀포 제주국제컨벤션센터

제 2 절 연구 성과 활용 계획

1. 연구성과 활용 목표 및 실적 대비

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2		1		
	달성				4		

2. 연구성과 활용 계획

가. 실용화 및 산업화 계획

- 자체 사업화(상품화) 계획 : 2(자체 기술 이전)

나. 기술 확산 계획

- 교육·지도 계획 : 2 (추가 계획 2)
- 홍보 계획 : 1 (전시회 참가)

다. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 국제 특허 등록 : 미국 1, 중국 1
- 특허 출원 : 1건 (국내)

라. 추가 연구계획 및 타 연구에 활용 계획

- 전 축종(소, 말, 산양, 돼지 등) 대상 복제동물 생산기술 확립
- * 복제 산양 생산기술 확립 연구에 활용 중임

마. 산업화를 통한 기대 효과

(1) 경제적 파급효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	33,600	40,300	48,300	-	-	122,200
경제적 파급효과	157,500	157,500	157,500	-	-	472,500
부가가치 창출액	10,000	11,000	12,000	-	-	33,000
합계	201,100	208,800	217,800	-	-	627,700

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

(2) 논문분석 측면

Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration—insights from studying annual renewal of deer antlers. Li C 등(2009, Curr Stem Cell Res Ther.)은 녹용에서의 핵치환 및 세포배양기술을 개발 함.

Effects of pilose antler and antler glue on osteoporosis of ovariectomized rats. Zhong Yao Cai. Meng HY(2009). 녹용세포에서 생리활성인자(골다공증치료)의 분리로 녹용세포의 의학적 이용에 국한 함.

3. 제품 및 시장 분석

가. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 사슴 인공수정 및 수정란 이식의 산업화 기반 구축
 - 국내 사슴 인공수정은 일부 단체 및 조합에서 제한적인 이용, 이를 확대하여 새로운 사슴 개량 기반 개척
 - 수정란이식기반 마련을 통한 개량의 가속화 촉진
 - 국내 최적의 경제동물인 사슴 수정란이식기술의 선도적 기반 확립

○ 수정란 이식사업의 국내시장규모 및 발전방향

축종 (동물 명)	국내 시장 규모						특성	기타(근거) (임신가능 두수 기준)
	정액	보관료	수정료	수정란	보관료	시술료		
애완견	480억	48억	1,000억	3,600억		2,000억	1% 시장 형성 시 1,200천두×2회×20,000원(정액) * 수정란 : 5~100만원/개	
*사슴	500억	50억	1,300억					
한우	700억	60억	1,500억	4,500억		4000억		
국내의 주요 수요처 현황		1. 농가 : 소-35만가구, 사슴-1만3천가구, 산양-5만4천가구, 말-463가구 * 축종별 사육두수(가임 암컷 수) : 2009.12. 축협조사월보(통계자료) - 소:2,356천두(1,200천두), 사슴:140천두(52천두), 2. 애완동물애호가(개 : 80만 가구, 1,860천 마리 사육, 임신가능 암컷-1,200천두) 3. 농업계 대학 및 연구소 - 연구재료 제공(정액, 체세포, 난자, 수정란, 특정미생물 및 종자 등) 4. 병원 - 산과병원(연구재료 제공), 이비인후과병원(불임시술자의 유전자원보존대행), - 기타 미생물관련 특정세포 보관대행(암세포, 특정병원균 등) 5. 동(식)물원 - 특정 동(식)물 유전자원 공급, 생산대행, 보관, 인공수정기술 1. 농업계 대학, 병원 및 연구소 - 연구재료 제공(정액, 체세포, 난자, 수정란 등) 2. 한국계 이민국가 : 미국, 캐나다, 멕시코 등 - 사슴산물 제공, 고국 향수 제공(수출 가능)						

(2) 산업화를 통한 기대효과

○ 사슴 수정란이식기술 보급 확대

- 국내 농가당 평균 사슴사육두수 : 12.6두
- 농가당가임 사슴보유두수:18개월령이상의 암사슴수(41,469)/사육농가수(10,280)=4.4두
- 외국인 초청 수정란이식 시술료 : 연간 4억이상 외화소비(1,000천원/두)
- 국내기술에 의한 가임사슴의 20% 인공수정시 번식비용 절감액 : 105억원
- * 농가당 보유가임사슴수(4.4두)×농가수(12,000)×도입 수정란시술료(1,000천원)×20%
- 국내기술에 의한 가임사슴의 20% 수정란이식시 자육생산에 의한 소득액 : 128억원
- 수입사슴의 대체효과 : 사슴수입에 의한 외화낭비 169억원 이상

○ 사슴녹용세포를 이용한 생리활성물질의 생산과 핵이식 수정란이식 기술 개발

뉴질랜드, 러시아, 캐나다, 중국 및 호주 등에서 녹용의 최대 소비국인 우리나라에 수출을 위한 전략 상품으로 건녹용, 녹용캡슐, 녹용각환, 녹용주, 녹각 공예품 등 매우 다양하게 개발되고 있으며, 특히 뉴질랜드에서는 녹용을 상품화하기 위한 과학화에 국가적 차원으로 개발을 지원하고 있다. 다각화 되고 있는 녹용제품등의 수입에 의존에서 벗어나 녹용세포에서의 생리활성물질의 생산을 통해 특정분야에 효과를 입증할 수 있으면 핵이식과 수정란이식 기술 등을 통해 균일화된 제품을 생산 보급할 수 있다.

○ 수정란 이식사업의 경제적 효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	33,600	40,300	48,300			
경제적 파급효과	157,500	157,500	157,500			
부가가치 창출액	10,000	11,000	12,000			
합 계	201,100	208,800	217,800			

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

(1) 특허분석 측면

- 기존 발정동기화, 배란동기화, 핵이식 수정란이식 등의 특허기술은 사슴이 아닌 다른 대가축 및 소가축에 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 사슴에서의 번식능력의 향상과 계획번식의 가능성의 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존의 녹용세포의 생리활성인자 추출의 특허기술은 골다공증 치료 등에 국한되어 있지만 본 연구과제에서는 생리활성인자의 병리적 접근뿐만 아니라 다른 작용에 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

(2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 생리조절분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 현장 실용화방향으로 연구를 추진하여 "사슴의 체내 난포란을 이용한 핵이식 후 발달 수정란의 성장효율 및 핵이식란 이식에 의한 산자의 생산과 발달에 관한 연구" 논문 등을 한국가축번식학회지, 한국수정란이식학회지 등에 게재할 계획임
- 기존 논문은 줄기세포 배양 및 형질전환등에 치중되어 있으므로 본 연구과제에서는 녹용세포에서의 생리활성화 물질의 간단한 추출을 통한 분류과정을 진행할 계획임

(3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 녹용제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 보혈작용 등의 분야에 국한되어 있고 녹용제품의 형태가 단순한 열처리등과 다른약제등을 첨부한 것에 국한되어있다. 녹용제품의 구매를 꺼리거나 거부감이 드는 이유 중에 하나는 포함된 약제들의 향과 단미적으로 거부감을 일으키는 경우가 대부분을 차지하고 있으며 이런 문제점등을 보완하기위해 특정 효능의 생리활성인자의 추출을 통한 단일효과의 녹용제품이 개발되어야 한다. 또한 녹용자체의 판매가 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 관련농가 및 수출에 효과를 얻을 수 있는 방향으로 연구를 추진하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 일본 박람회 참관

1. 박람회 참가 목적

가. 박람회 명 : 2010년 일본 국제바이오박람회

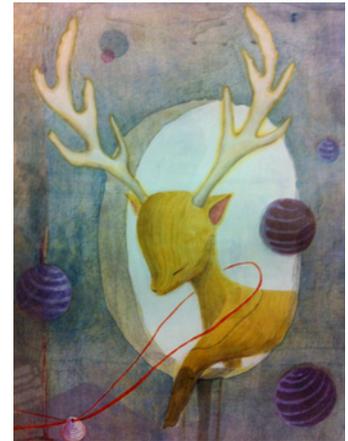
나. 참가 목적 : 복제 장비 자료 수집

다. 참가기간 : 2010. 07.29 - 08.02

2. 박람회 참가 시 수행 내용

가. 간편 핵이식 장비 업체 정보 수집

나. 바이오-의료 산업관련 장비



제 2 절 중국 박람회 참관

1. 박람회 참가 목적

가. 박람회 명 : 2011년 상하이 국제전자산업 엑스포

나. 참가 목적 : 의료 산업 분야 자료 수집

다. 참가기간 : 2011. 07.21-23

2. 박람회 참가 시 수행 내용

가. 의료장비(임신진단기 등) 자료 수집

나. 의약품 관련 산업 박람회 참관



<2011년 상하이 국제 전자 - 의료산업 엑스포 참가>

제 7 장 참고문헌

- 김기중, 이용안, 김방진, 김용희, 정미선, 이주형, 이장희, 류범용. 2012. 녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 33. - 베스트 포스트상 수상
- 김기중, 이용안, 김방진, 김용희, 하승정, 이주형, 이장희, 류범용. 2012. 녹용세포의 효율적인 체외배양 시스템 개발에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 32.
- 김찬규. 1993. 사슴사육과 관리. 오성출판사. pp. 120-153.
- 김현중, 김인철, 이장희, 손동수, 김일화, 최선호, 류일선, 장규태, 임경순. 2000. 소 정액의 동결건조 보존에 관한 연구. 한국축산학회분야학술발표.(PB20107).
- 김현중, 임경순, 진동일, 오성중, 양보석, 김진영, 김인철, 이장희, 손동수, 최선호. 2000. 소 난구세포를 이용한 복제수정란생산에 관한 연구. 한국축산학회분야학술발표.(PB20108).
- 류재원, 정영채, 김창근, 이장희, 손동수, 김인철. 2000. 농장사육 엘크사슴의 계절적 정액성상과 동결 정액이 수태율에 미치는 영향., 한국축산학회분야학술발표.(PB20114).
- 박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 이장희, 임재삼, 김인철, 손동수. 2000. PGF₂α 또는 Ovsynch법으로 발정 동기화한 한우의 임신율. 한국축산학회분야학술발표.(PB20111).
- 박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 최선호, 이장희, 김인철, 손동수. 2000. 한우 수란우의 임신율에 대한 hCG 영향과 혈장 요소태질소 수준과의 관계. 한국수정란이식학회지1:115-120.
- 성유석. 1999. 사슴과 곰 : 번식 사양 관리. 내외출판사.
- 신현아, 정영채, 김창근, 정영호, 문신용, 이장희, 방 명길, 김광식, 연승은, 최선실, 류범용. 2000. 돼지정액의 Taurine, α-Tocopherol의 첨가가 동결정자의 성상과 기능에 미치는 영향. 한국축산학회분야학술발표.(PB20099).
- 이장희 등. 2002. 동결정액 포장방법이 돼지정액의 성상 및 번식성적에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 26:119-124.
- 이장희 등. 2002. 돼지 액상정액의 보존액, 보존온도 및 기간이 정액성상과 번식성적에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 26:9-16.
- 이장희 등. 2002. 사슴의 발정동기화 및 인공수정기술 개발. 대한수의사회지 38(7): 626-637
- 이장희 등. 2003. 돼지 인공수정 효율 향상을 위한 정액품질 평가, 동결정액 생산 및 발정동기화기술 개발. 농촌진흥청 최종보고서.
- 이장희, 김상우, 김인철, 이장형, 서경덕, 김창근. 1996. 재래가축 및 경제동물의 동결정액 생산기술 개발에 관한 연구 II. 사슴. 1996년도 축산시험연구보고서 제 2권 종축개발부편. pp. 54-56.
- 이장희, 김인철, 손동수, 김창근, 서경덕, 박충생. 1997. 재래가축 및 경제동물의 동결정액 생산기술 개발에 관한 연구-재래돼지. '96 축산시험연구보고서. pp.39 -41.
- 이장희, 김인철, 손동수, 김현중, 김상우, 이동원, 김창근, 백순화. 1999. 사슴의 번식과 비번식계절에 있어서 정액의 성상 및 동결과정중 정자활력의 변화. 축산분야종합학술발표(P99135). p. 161.
- 이장희, 김인철, 손동수, 류재원, 김현중, 김상우, 유충현, 김창근, 백순화. 2000. 번식계절 직전 발정동기화 처리가 사슴의 수태율에 미치는 영향. 한국축산학회분야학술발표.(PB20112).
- 이장희, 김인철, 이동원, 류일선, 박성재, 서국현, 김상우, 유충현, 정경용, 백순화, 김창근, 손동수. 2001. 사슴의 임신진단기법 개발에 관한 연구. 한국가축번식학회 춘계학술발표대회. pp. 4. (구두발표)
- 이장희, 박충생. 1990. 한국재래산양의 임신기간중 혈중 progesterone 및 estrone sulphate 농도의 변

- 화. 한국가축번식학회지. 14(3):213-221.(1998년 석사학위 논문)
- 이장희, 백순화, 이주형, 김기중, 류범용, 박성재, 허태영, 심호섭, 이종완. 2012. 사슴에 있어서 성선자극호르몬 이 난포란의 발달에 미치는 영향. The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 104. (2012. 10. 25~26. 제주국제컨벤션센터)
- 이장희, 백순화, 이주형, 김세철, 이신영, 이병욱. 2010. Leuprorelin acetate 투여가 10주령 쥐의 성행동과 혈 중 Testosterone 농도의 변화에 미치는 영향. The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology. p. 84.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 김기중, 김용희, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2011. 사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발. *Reprod Dev Biol.*, 35(2) : 44.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2012. 사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향. *한국수정란이식 학회지.* 29(supl.) : 63.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2010. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology. p. 96.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2011. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 60.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 곽노일, 이후일, 서동철, 정대영, 김관국, 김범호, 박성재, 허태영. 2010. 엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향. The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology. p. 107.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 박달영, 곽노일, 서동철, 정대영. 2011. Phenol Red의 색상변화를 이용한 주입 전 간편 품질 평가 돼지 액상정액의 개발. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 58.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 이후일, 서동철, 정대영, 김범호, 박성재. 2011. 엘크 사슴에 있어서 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지.* 26(supl.) : 59.
- 이장희, 백순화, 이주형, 허영남, 김남형. 2013. 꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지.* 29(supl.) : 70. (단국대. 2013. 5. 24)
- 이장희, 백순화, 이주형, 황동국, 박지영, 이우람, 연승호. 2011. U-기반 실시간 바이오 센싱을 이용한 동물 번식관리 시스템 개발. *Reprod Dev Biol.*, 35(2) : 84.
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지.* 29(supl.) : 69. (단국대. 2013. 5. 24)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 동해보호제가 산양 및 무폴런 정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향. *한국동물번식학회지.* 37supl.2) : 52. (건국대. 충주캠퍼스. 2013. 6. 20~21)
- 이장희, 백순화, 지달영, 박달영, 김관국. 2008. Methylene blue를 이용한 간편 정액진단키트와 이를 이용한 돼지 간편 품질진단 액상정액개발. 8차 발생공학 국제학술심포지움 p. 58-59.
- 이장희, 백순화, 지달영, 박달영, 김관국. 2008. Methylene blue를 이용한 정액의 간편 품질 식별기술 개발. 8차 발생공학 국제학술심포지움 p. 56-57
- 이장희. 2001. 사슴의 동결정액생산, 인공수정 및 임신진단기법 개발. 2001. 농림부. 농림기술개발과제 최종보고서.
- 이장희, 김인철, 이동원, 류일선, 박성재, 서국현, 김상우, 유충현, 정경용, 백순화, 김창근, 손동수. 2001.

- 사슴의 발정동기화 및 Ov-Sync.방법에 따른 예정시각 인공수정 후 수태율 및 분만율. 발생공학국제심포지움 및 학술대회 발표자료집. p. 66-67.
- 이장희. 돼지인공수정. 돼지 인공수정을 이용한 번식효율 향상기술. 농림부 발간등록 11-1390271-000060-14. pp. 9-31. 2003.
- 허태영 등. 2006. Comparison of Two Types of CIDR-based Timed AI Protocols for Repeat Breeder Dairy Cows. *Journal Reproduction and development* 53(3):639-645.
- 허태영 등. 2007. The Effects of Administering Estradiol Benzoate together with Progesterone during the Growing or Static Phase of the Dominant Follicle in CIDR-Treated Lactating Dairy Cows. *Journal Reproduction and development* 53(3):591-596.
- Allen PL, Asher GW. 1988. Progressive fallow farming. Proceedings of course on fallow deer farming held at Ruakura Agricultural center. February. 23-26.
- Asher GW, Day AM, Barrell GK. 1987. Annual cycle of lightweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer of the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fert.* 79:353-362.
- Asher GW, Gallagher DS, Tate ML. 1999. Tedford C Hybridization between spotted deer (*Cervus nippon*) and axis deer (*Axis axis*). *J. Hered.* 90(1):236-40.
- Asher GW, Scott IC, et al. 1997. Ultrasonographic monitoring of antral follicle development in red deer. *J. Reprod. Fert.* 111:91-99.
- Asher GW. 1993. Effects of an antiandrogen treatment on morphological characters and physiological functions of male fallow deer (*Dama dama* L.). *J Exp Zool.* 267(3):288-98.
- Assey RJ, Purwantara B, Greve T, et al. 1993. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology.* 39:1321~1330.
- Badtram GA, Gaines JD, Thomas CB, et al. 1991. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology.* 35:1153-1167.
- Bainbridge DRJ, Jabbour HN. 1997. Effect of pregnancy and exogenous interferon on synchronous pulsatile release of oxytocin and luteolytic prostaglandin F_{2α} in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fert.* 111:299-307.
- Berg DK, Asher GW (2003): New developments reproductive technologies in deer. *Theriogenology* 59(1):189-205.
- Berg DK, Thompson JG, Asher GW (2002): Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*): Part 2. The timing of in vitro nuclear oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 70(1):77-84.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, et al. 1995. Erogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* 43:31-40.
- Curran S, Ginther OJ. 1991. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology.* 36:809-814.
- Curran S, Kastelic JP, Ginther OJ. 1999. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. *Anim. Reprod. Sci.* 19:217-227.
- Edmondson AJ, Fissore RA, Pashen RL, et al. 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine

- reproductive tract. I. Normal and pathological ovarian structures. *Anim Reprod. Sci.* 12:157-165.
- Eloranta E, Timisjarvi J, Nieminen M, Ojutkangas V, Leppaluoto J, Vakkuri O. 1992. Seasonal and daily patterns in melatonin secretion in female reindeer and their calves. *Endocrinology.* 130(3):1645-52.
- Esther Bender, Enda Bender. 1993. Search for a farm(1998). *Vet. Rec.* 133(13):322-3.
- Fissore RA, Edmondson AJ, Pashen RL, et al. 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus. *Anim. Reprod. Sci.* 12:167-177.
- Flierman PA, Hogerzeil HV, Hemrika DJ. A, 1997 prospective, randomized. cross-over comparison of two methods of artificial insemination by donor on the incidence of conception: intracervical insemination by straw versus cervical cap. *Hum. Reprod.* 12(9):1945-8.
- Ghosh, P. and R. Roubin. 2000. Antler cartilage cells release factor that stimulate other cartilage cells to divide and make a new matrix. (Institute of bone and joint research, Australia). The 1st international symposium on antler science and product technology. pp. 27.(April 9 to 12. Banff Centre, Canada)
- Ginther OJ. 1986. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Equiservices, Cross Plains, WI.* pp. 378.
- Gordon I. 1997. Reproduction in horse, deer and camelids. CAB international press. pp. 168-188.
- Helliwell RJ, Williams LM, 1994 The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. *J. Endocrinol.* 142(3):475-84.
- Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, et al. 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology.* 37:457-463.
- Izaike Y, Suzuki O, Shimada K, et al. 1991. Observation by ultrasonography of embryonic loss following the transfer of two or three embryos in beef cows. *Theriogenology.* 36:939-947.
- Jabbour HN, Asher GW, Smith JF, Morrow CJ. 1992. Effect of progesterone and oestradiol benzoate on oestrous behaviour and secretion of lateralizing hormone in ovariectomized fallow deer (*Dama dama*). *J. Reprod. Fertil.* 94(2):353-61.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1990 Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology.* 33:1269-1278.
- Kastelic JP, Pierson RA, Ginther OJ. 1990. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology.* 34:487-498.
- Kennaway DJ, Rowe SA. 1995. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 49:423-35.
- Kenneth G. Whitehead. The whitehead encyclopedia of deer. 1993. Swan Hill Press. P.29-32
- Kierdorf U. 1993. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thiamin*). *J. Reprod. Fertile.* 98(2):471-80.
- Kito S, Okuda K, Miyazawa K, et al. 1986. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. *Theriogenology.* 25:325-333.
- Kolle R, Chaplin RE. 1973. The influence of age and season on the activity of the testes and

- epididymides of the fallow deer, *Dama dama*. *J. Reprod. Fertil.* 30(3):361-9.
- Laing JA, Heap RB. 1971. The concentration progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.* 127:xix.
- Lee, J.H. et al. 2000. Semen cryopreservation of three different deer breeders in Korea. The 1st international symposium on antler science. p.48-49.
- Lee, Jang-Hee, Soon-Hwa Baek, Joo-Hyung Lee, Beom-Yong Ryu, Ki-Joong Kim, Yong-Hee Kim, Seong-Jae Park, Tae-Yeong Huh, Yeong-Hoon Jeong, Ho-Sup Shim Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk. The 11th International Symposium on Developmental Biotechnology "Recent Trends in Reproductive Biotechnology". Supl. p. 33-34. (Oct. 21, Friday. 2011. Chonnam National University, Korea.)
- Lee. J.H. 2000. (April 9 to 12. Banff Centre, Canada) Effect of synchronization of estrus, AI timing and synchrony of ovulation on conception rate of farmed elk(wapiti) deer in Korea. The 1st international symposium on antler science and product technology. p.49-50.
- Lee. J.H. 2000. Changes of serum concentration of progesterone during the oestrus cycle, oestrus synchronization periods and early pregnancy of elk. The 1st international symposium on antler science. p. 51.
- Lincoln GA. Photospheric-melatonin relay in deer. 1998. *Acta Vet Hung.* 46(3):341-56
- Locatelli Y, Vallet JC, Huyghe FP, Cognié Y, Legendre X, Mermillod P (2006): Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: Effect of season and culture conditions. *Theriogenology* 66(5):1334-1342.
- Loudon AS, Curlewis JD. 1989. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J. Reprod. Fertil.* 83(2):729-38.
- Meydon MJ, Milne JA, Brinklow BR, Loudon AS. 1995. Manipulating melatonin in red deer (*Cervus elaphus*): differences in the response to food restriction and lactation on the timing of the breeding season and prolactin-dependent pelage changes. *J. Exp. Zool.* 273(1):12-20.
- Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schpewe MC, Williamson LR, Bush M, Rail WF. 1993. Successful interuterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi tamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 99:459-465.
- Monfort SL, Brown JL, Wood TC, Wemmer C, Vargas A. Williamson L R, Wildt DE. 1993 Seasonal patterns of basal and GnRH-induced LH, FSH and testosterone secretion in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J. Reprod. Fertil.* 98(2):481-8.
- Monfort SL. 1993. Seminal vesiculitis and epididymitis in an Anglo- Nubian buck. *J. Reprod. Fert.* 99:459-465.
- Morrow CJ, Asher GW, Berg DK, Tervit HR, Pož PA, McMillan WH, Beaumont S, Hall DRH. Bell ACS. 1994. Embryo transfer in fallow deer. *Theriogenology.* 42:579-590.
- Muir PD, Sykes AR, Barrell GK. 1998. Changes in blood content and histology during growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) and their relationship to plasma testosterone levels. *J. Anat.* 158:31-42.
- Newman RE, Foldes A, Maxwell CA, Rigby RD, Wynn PC. 1991. Identification of a seasonal elevation in daytime melatonin levels associated with the rut in fallow bucks (*Dama dama*):

- the effect of day length and exogenous melatonin. *J. Pineal. Res.* 11(3-4):101-10.
- Revol B, Wilson PR. 1991. Ultrasonography of reproductive tract and early pregnancy in red deer. *Veterinary Record.* 128:229-233.
- Rolf HJ. 1993. Effects of an antiandrogen treatment on the antler cycle of male fallow deer (*Dama dama* L). *J. Exp. Zool.* 266(3):195-205.
- Sauer MJ, Fonkes JA, Worsfold A, Morris BA. 1986. Use of progesterone II-glucuronide-alkaline phosphates conjugate in a sensitive microtitre-plate EIA of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. *J. Reprod. Fert.* 76:375-391.
- Siriaronrat B, Comizzoli P, Songsasen N, Monfort SL, Wildt DE, Pukazhenti BS (2010): Oocyte quality and estradiol supplementation affect *in vitro* maturation success in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology* 73(1):112-119.
- Suttie JM, Breier BH, Gluckman PD, Littlejohn RP. 1992. Webster JR Effects of melatonin implants on insulin-like growth factor 1 in malar deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* (1):111-9.
- Suttie JM, Lincoln GA, Kay RN. 1984. Endocrine control of antler growth in red deer stags. *J. Reprod. Fertil.* 71(1):7-15.
- Suttie, J.M. 2000. Deer velvet research : Does the data from growth mechanisms support the health promoting effects of the product?(Invermay Agricultural Centre, New Zealand). The 1st international symposium on antler science and product technology. pp. 26.(April 9 to 12. Banff Centre, Canada)
- Timothy L Biel. 1996. The deer family library Binding. Published by Creative Education. pp. 6-21.
- Tyler NJ. 1994. Role of gonadal hormones in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J. Reprod. Fertil.* 101(1):129-38.
- West NO. 1987. Annual cycle of lightweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil.* 79(2):353-62.
- Willard ST, Flares-Farnworth G, Chapman S, Drew ML, Hughes DM, Neuendorff DA, Randel RD. 1998. Hybridization between wapiti (*Cervus elephus manitobensis*) and spotted deer (*Cervus nippon*): a comparison of two artificial insemination techniques. *J. Zoo. Wild. Med.* 29(3):295-9.
- Williams LM, Hannah LT, Adam CL, Bourke DA. 1997. Melatonin receptors in red deer fetuses (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.* 110(1):145-51.
- Williams LM, Hannah LT, Kyle CE, Adam CL. 1996. Central melatonin receptors in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104(1):1-6.
- Yin Y, Tang L, Zhang P, Kong D, Wang Z, Guan J, Song G, Tang B and Z Li. 2012. Optimizing the condition for *in vitro* maturation and artificial activation of Sika deer. *Reprod Dom Anim* doi : 10.1111.
- Zomborszky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. 1999. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta. Vet. Hung.* 47(2):263-70.

<부록>

부록 1 - 연도별 실험 추진 내역

1. 2010년도 시험 추진 내역(시험일정)

2010년 윤봉산 사슴농장 시험 처리 계획(ELK)

종말 : 이강희 박사

번호	번호 처리	발정동기화 처리(다배란)				난자채취 (사슴자 10/2 09시)	수정/교배 정액명 10/05 06:00	시술자	수정시 자궁태	수정란 채취 이식(두) (10/10)	핵이식 (10/10) 발배	임신진단 (카파) (21일령)	임신기간	비고
		CIDR삽입 (상태)	CIDR제거 (상태)	PG600 FSH	쿼타곤 (추정시)									
1	123	9/15 14:00 양호	9/30 ○	FSH		채취(허) 좌5 우5	-	박성재						10월 21 합사 개시
2	124	양호	9/30 ○	FSH			-	박성재		미수정이식				
3	125	질(2)이 포함 포함	9/30 ○	PG600	10/3루사		당진1027	박성재						10/3수정시 자궁반응X
4	126	매우허약 CIDR노출	9/30 ○	PG600	10/3루사		당진1027	박성재						
5	127	양호, 건강	9/30 ○	FSH		채취(허) 좌5 우6	-							
6	128	양호	9/30 ○	FSH	10/3루사		당진1027	박성재		수정란회수		채혈 필요		10/3수정시 반응 양호 10/10 수정란상태 오른쪽1개 -상실배 왼쪽 2개 -상실배1 -미수정란1
7	129	양호, 약간허약	9/30 ○	PG600						미수정이식				
8	130	양호	9/30 ○	PG600	10/3루사		당진1027	박성재						
9	131	양호	9/30 ○	PG600										
10	132	양호	9/30 ○	PG600						수정란회수		채혈 필요		수정란 2개이식
11	134	양호, 허약	9/30 ○	PG600	10/3루사		당진1027	박성재						수정란용 승
12	135	양호, 허약	9/30 ○	PG600	10/3루사		당진1027	박성재						수정란용 승
*	엘크 121	허약, 폐사												수정란용 승

- CIDR 삽입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 9월15일 14:00~17:00 (이강희, 이우형, 김병호, 한동원 2, 조광준, 중앙대2)
- CIDR 제거 일시 : 2010년 9월 30일 (PG600 5ml 근육주사, FSH 3.0 ml, Lutalyse 5ml 근육주사)
- 인공수정 일시 : 2010, 10, 09 * 인공수정 혼유,사산 등 시험대상 개체의 변동사항 연락(이강희 : 041-585-8250,)
- 분만예정일 : 엘크 2010, 06, 08 (임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181), 꽃사슴 2010, 05, 16 (225일 기준시)
* 전년도(2009) 번식결과 : 인공수정 자통 1두, 자연증부 자통 6두 (작성 : 2010, 09, 27)

2010년 윤봉산 사슴농장 시험 처리 계획(꽃사슴)

종말 : 이강희 박사

번호	번호 처리		발정동기화 처리(다배란)				난자채취 (사슴자 10/2 09시)	수정/교배 정액명 10/05 06:00	시술자	수정시 자궁태	수정란 채취 이식(두) (10/10)	핵이식 (10/10) 발배	임신진단 (카파) (21일령)	임신기간	비고
	이표 번호	목공이 번호	CIDR삽입 (상태)	CIDR제거 (상태)	PG600 FSH	쿼타곤 (추정시)									
1	115	15	9/17 14:00 Pong-CIDR P# 10g	9/30 ○	FSH		채취(허) 좌5 우5	-							
2	117	16	Pong-CIDR P# 10g	○	FSH		난소적출 후 도태 좌13,우10								
3	118	18	Pong-CIDR P# 10g	○	PG600	10/3		당진1027	박성재						
4	119	19	스프지 손으로 삽입	○	FSH			당진1027	박성재		수정란채취 오른쪽1개 왼쪽 없음				배란된수정란 확인 X
5	120	20	Pong-CIDR P# 10g	○	PG600							미수정			
6	121	21	Pong-CIDR P# 05g	○	PG600							미수정			
7	122	22	Pong-CIDR P# 05g	달락	PG600			당진1027	박성재						
8	123	23	폐사(9/19)												
9	124	24	스프지 손으로 삽입	○	PG600			-	-		125번 수정란 이식				수정란 이식시 자 궁반응도달 난해
10	125	17	Pong-CIDR P# 10g	○	FSH			당진1027	박성재		수정란채취 (미수정란 2개 비정상 2개)				
11	126	97	스프지 사나움	○	PG600							미수정			
12	127	27	Pong-CIDR P# 05g	○	PG600			당진1027	박성재						

- CIDR 삽입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 9월17일 14:00~17:00 (이강희, 이우형, 안영목)
* 마취 : 펜타진 1.0ml/두(5~10분 후 마취 개시, 30분~1시간 마취, 해독 : 콘트롤린 1.5ml 주사)
- CIDR 제거 일시 : 2010년 9월 30일 (PG600 2.5ml 근육주사, FSH 2.0ml, Lutalyse 2.0ml 근육주사)
- 인공수정 일시 : 2010, 10, 09 * 인공수정 혼유,사산 등 시험대상 개체의 변동사항 연락(이강희 : 041-585-8250,)
- 분만예정일 : 엘크 2010, 06, 08 (임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181), 꽃사슴 2010, 05, 16(225일 기준시)
* 꽃사슴 마취 : <헥시플린(50mg/ml) 4ml + 증류수 6ml + 자이진 2ml>여서 꽃사슴 두달 0.3m(20~30분간 마취)*0.6m(50~60분간 마취) 주사

2010년 한록원 시험 기록(ELK)

번호	명호 처리	인공 수청시간	발정동기화 처리						시술자	비고	수정시 상태(자궁)
			CIDR삼입 (08.11)	CIDR저거 (08.25)	P.600 (08.25)	Lutalyse (08.25)	플드로핀 (08.25)	황타길 (08.27)			
1	221		○	○	○	○	×				상
2	045		○	○	○	○	×				중
3	222		○	○	○	○	×	○			상
4	223		○	○	○	○	×		○		중
5	224		○	○	○	×	○	○			중
6	225		○	○	○	×	○	○			상
7	226		○	○	○	×	○	○			상
8	243		○	○	○	×	○	○			상
9	321		○	○	○	○	×	○		발정미약(08.28)	하
10	239		○	○	○	×	○		○		상
11	240		○	○	●	×	×		○		상
12	241		○	○	○	×	×		○		중
13	242		○	○	●	×	×		○		상
14	244		○	○	○	×	○		○		중
15	245		○	○	○	×	×		○	농장주수정 실습(08.25)	하
16	246		○	○	○	×	×		○		중
17	247		○	○	●	×	×		○		하
18	248		○	○	●	×	×		○		하
19	249		○	○	●	×	×		○		중

1. CIDR 삼입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 8월11일 18:30시작 담당 : 이강희 박사
2. CIDR 제거 일시(P.600 근육주사 ○:1병/두 ●:4.5병/두 , Lutalyse, 플드로핀 근육주사) : 2010년 8월 25일 16:20시각 17:45 끝
3. 인공수정 일시 : 2010년 8월 28일 08:24시각 ~ 10:45 끝, 황타길(8월27일 플루건 사용6두, 8월28일 수정 시 주사 13두)
- 4., 분판여정일 : 2011. 5. 3 (엘크 임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181)
- * 유,사산 등 시험대상개체의 변동사항 연락 - 이강희 : 041-585-8250

2010년 무릉원 시험 기록(ELK)

담당 : 이강희 박사

번호	명호 처리	인공 수청시간	발정동기화 처리						시술자	비고	수정시 자궁상태 (08.28)
			CIDR삼입 (08.11)	CIDR저거 (08.25)	P.600 (08.25)	Lutalyse (08.25)	황타길 (08.27)	황타길 (08.28)			
1	217		○	○	○	○	○				상
2	218		○	○	○	○	○			건선,허약(11),백선(25)	상
3	03-020		○	○	●	×		○			중
4	219		○	○	○	×	○			조기이유, 허약(8/11), 백선(8/25), 농장주 수정실습(8/28)	중
5	111		○	○	○	○	○				중
6	322		○	○	○	●	×	○		이표재로감찰(8/11)	상
7	323		○	○	○	○	○			이표재로감찰(8/11)	하
8	106		○	○	○	●	×	○		건선,허약(8/11)	중
9	112		○	○	○	○	○	○		허약(8/11)	중
10	109		○	○	○	●	×	○			중
11	110		○	○	○	○	×	○			중
12	324		○	○	○	○	×	○		이표재로감찰, CIDR삼입 농장주실습(8/11) 초입확인 (8/25)	하
13	325		○	○	○	●	×	○		이표재로감찰, CIDR삼입 농장주실습(8/11)	중

1. CIDR 삼입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 8월11일 18:30시작
2. CIDR 제거 일시(P.600 근육주사 ○:1병/두 ●:4.5병/두 , Lutalyse 근육주사) : 2010년 8월 25일 17:25시각 ~ 18:00 끝
3. 인공수정 일시 : 2010년 8월 28일 11:07시각 ~ 12:45 끝, 황타길(8월27일 플루건 사용6두, 8월28일 수정시 주사 7두)
- 4., 분판여정일 : 2011. 5. 3 (엘크 임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181)
- * 유,사산 등 시험대상개체의 변동사항 연락 - 이강희 : 041-585-8250

2010년 송암 시험 기록(ELK)

번호	명호 처리	인공 수정시간	발정동기화 처리						시술자	비고	수정시 상태(과중)	
			CIDR삼입 (08.18)	CIDR제거 (09.01)	P.G600 (09.01)	Lutalyse (09.01)	플드로핀 (09.01)	고나돈 (09.04)				콘트롤 (09.04)
1	B19		○	○	○	×	○	○	×			중
2	B29		×	×							CIDR삼입실패	
3	D54B		○	○	○	○	×	×	○			중
4	D54B		○	○	○	○	×	○	×		지방침착(수정시확인)	하
5	B8		○	○	○	×	○	×	○			중
6	B30		○	○	○	○	×	×	○			상
7	B31		○	○	○	○	×	○	×		지방침착(수정시확인)	하
8	찰06		○	○	○	○	×	○	×		중	중
9	B32		○	○	○	○	×	○	×			하
10	B33		○	○	○	○	×	×	○		수정x, 자궁내여이물질,미이관	
11	이표X		○	○	○	○	×	×	○		상	
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												

1. CIDR 삼입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 8월18일
2. CIDR 제거 일시(P.G600 근육주사 , Lutalyse, 플드로핀 근육주사) : 2010년 9월 1일 17:25시각 17:50 끝
3. 인공수정 일시 : 2010년 9월 4일 09:05시각 ~ 10:15 끝, 고나돈 5두, 콘트롤 5두 근육주사)
4. 분판예정일 : 2011. 5. 10 (일크 임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181)

담당 : 이강희 박사

2010년 거룩원 시험 기록(ELK)

번호	명호 처리	인공 수정시간	발정동기화 처리						시술자	비고	수정시 상태(과중)	
			CIDR삼입 (08.18)	CIDR제거 (09.01)	P.G600 (09.01)	Lutalyse (09.01)	플드로핀 (09.01)	고나돈 (09.04)				콘트롤 (09.04)
1	201		○	○	○	○	×	○	×			상
2	202		○	○	○	○	×	○	×			상
3	203		○	○	○	×	○	○	×			상
4	206		○	○	○	×	○	×	○			중
5	207		○	○	○	○	×	×	○			하
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												

1. CIDR 삼입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 8월18일
 2. CIDR 제거 일시(P.G600 근육주사 , Lutalyse, 플드로핀 근육주사) : 2010년 9월 1일 18:50시각 19:15 끝
 3. 인공수정 일시 : 2010년 9월 4일 11:15시각 ~ 12:10 끝, 고나돈 3두, 콘트롤 2두 근육주사)
 4. 분판예정일 : 2011. 5. 10 (일크 임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181)
- * 유.사산 등 시험대상개체의 변동사항 연락 - 이강희 : 041-585-8250

담당 : 이강희 박사

2010년 청송 시험 기록(ELK)

번호	명호 처리	인공 수정시간	발정동기화 처리							시술자	비고	유정시 상태(자궁)
			ClDR삼입 (08.18)	ClDR저거 (09.01)	PG600 (09.01)	Lutalyse (09.01)	폴드로핀 (09.01)	고나돈 (09.04)	콘트롤 (09.04)			
1	220		○	○	○	○	×	×				상
2	231		○	○	○	×	○	○	×			하
3	232		○	○	○	×	○	○	×			하
4	233		○	○	○	○	×	×	○			상
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												

1. ClDR 삼입일 (발정동기화 처리방법) : 2010년 8월18일
2. ClDR 저거 일시(PG600 근육주사, Lutalyse, 폴드로핀 근육주사) : 2010년 9월 1일 18:50시작 19:15 끝
3. 인공수정 일시 : 2010년 9월 4일 11:45시작 ~ 12:10 끝, 고나돈 3두, 콘트롤 2두 근육주사)
4. 분만예정일 : 2011. 5. 10 (엘크 임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181)
- * 유.사산 등 시험대상개체의 변동사항 연락 - 이강희 : 041-586-8250

담당 : 이강희 박사

2. 2011년도 시험 추진 내역(시험 일정)

2011년 운봉산 사슴농장 시험 처리 내역(ELK)

최종 정리 : 2011. 10. 27. 송팔 : 이강희 박사

번호	명호 처리	발정동기화 처리(다배란)			남자제란 (시술자) 10/1 15:10	남포수 10/1	상자수 10/1	수정/교배 정액량 10/2 10:20 ~ 11:40	수정란 채란/이식(두) (10/8)	합이식 수정란 (수정)이식 (10/8)	비고 10/20 합사 개사(전체) (수정)이식 자궁상태
		MEGA-100 급여(9/8) 중단(9/29) (상대: B.S.C)	발정/다배란 처리 (FSH)	최대값 (10-10) (10/2, 일)							
1	123		복8일 PGE2.9	GnRH				진득			
2	125		PGE2.9 FSH	GnRH				진득	채란(0)		당진홍우산술수정2전(10/2) 채란실패(10/8) 미이식
3	126		PGE2.9 FSH	채란/제란 (0)	좌:핵채1,소1 우:핵채1,대1,소1	좌:0개 우:1개(1등급1)		진득			수정2전(10/2)
4	127		PGE2.9	GnRH				진득			차공만송:노 정맥:복(10/2)
5	128		PGE2.9	GnRH				진득			
6	129		PGE2.9 FSH	채란/제란 (0)	좌:대1,소3 우:핵채, 소1	좌:3개(1등급1,3등급 이하2) 우:6개(1등급1,3등급 이하2)		진득	채란(0)		차공만송:700g 차공실패(10/8) 미이식(취업)
7	130		PGE2.9 FSH	GnRH				진득	채란(0)		차공만송:700g 차공실패(10/8) 미이식(취업)
8	131		PGE2.9 FSH	채란/제란 (0)	좌:소7 우:소5	좌:2개(1등급2개) 우:6개(1등급1,3등급 이하5)		진득			차공만송:700g 수정시킨지(10/2)
9	132		PGE2.9 FSH	채란/제란 (0)	좌:소2 우:소1	좌:1개(3등급이하1)		진득			차공만송:700g
10	134		PGE2.9	GnRH				진득			차공만송:700g
11	135		PGE2.9	GnRH				진득			차공만송:700g
12	124		PGE2.9	GnRH				진득			차공만송:700g

1. MEGA-100 급여개시일 (엘크 발정동기화 처리방법) : 2011년 9월 8일 09:00~17:00 (1일 1회 2.5g/두, 오전 급여, 영양제 추가 급여)
2. Dimethylbesteral(DMS) 급여개시일 (꽃사슴 발정동기화 처리방법) : 2011년 9월 8일 09:00~17:00 (1일 1회 2.0g/두, 오전 급여, 영양제 추가 급여)
3. 급여 중단일 발정 및 다배란처리(9/29) : 발정유기 - PG600 5ml, Lutalyse 5ml, 다배란 : FSH 3.0 ml, Lutalyse 5ml, 근육주사.
4. 인공수정 일시 : 2010. 10. 02 = 인공수정 10~12시간 전 후 GnRH 주사 MGA(melangesterolacetate) = MEGA-100
5. 분만예정일 : 엘크 2012. 06. 07 (임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181), 꽃사슴 2012. 06. 15 (225일 기준)
- * 전년도(2010년) 번식결과 : 인공수정 6두, 수정란이식 2두에서 엘크 134-자루 생산(2011.6.11분만), 엘크124 분만시 개사(수정란이식 자루 생산, 2011. 5. 24) (전년도에는 총포와 합사시키지 않았음) = 전년도(2009년) 번식결과 : 인공수정 자루 1두, 자연종후 자루 6두 (작성 : 2010. 09.27)

2011년 윤봉산 사슴농장 시험 처리 계획(꽃사슴)

출발 : 이장의 박사

번호	영양 처리		발정동기화 처리(시비관)			남치계란 (시술제) 10/0850T 1200	남치수 10/7	남치수 10/7	수정/2배 정리업 10/02 12:00 13:30	수정관 제란7 이상(5) (10/8)	혈이식 수정관이상 (10/8)	비 고(10/20) 합시 개시(원계) (수정/혈이식 치중일대)
	이표 번호	육질이 번호	DMS급여 (9/8)	발정/시비관 처리 (FSH)	취타길 (1200) (10/2, 10)							
1	115	15		PGF2 β FSH	GnRH							
2	118	18		PGF2 β FSH		지관①	피10(대2,중2,소1) 우3개(대1,중1,소1)	피10(1중급6,3중급33중급이하1) 우4(1중급3,3중급이하1)				폐사(00%)
3	119	19		PGF2 β FSH	GnRH							
4	120	20		PGF2 β FSH		지관②	피4개(대2,중2) 우4개(대2,중2)	피4개(1중급) 우4개(1중급)				
5	121	21		PGF2 β FSH	GnRH							
6	124	24		PGF2 β FSH		지관①	피6개(대3,중1,소1) 우3개(대1,중1,소1)	피9개(1중급2,2중급4,3중급이하3) 우6개(1중급2,2중급2,3중급이하2)				
7	125	17		PGF2 β FSH	GnRH							
8	125	97		PGF2 β FSH		지관③	피5개(대3,중2) 우3개(중2,소1)	피5개(1중급1,2중급1,3중급이하3) 우3개(1중급1,3중급이하2)				폐사(00%)
9	127	27		PGF2 β FSH	GnRH					지관②	수정관x 취타관	이의 산재(0.8) 지관 : 장상(0.5)
10		135		PGF2 β FSH	GnRH					지관①	수정관x	이의 산재(0.8)도양
11		137		PGF2 β FSH	GnRH							

1. DMS 급여일 (발정동기화 처리방법) : 2011년 9월8일 1400~17:00 (이장의, 이주형, 임영복). Dimethylbesterol(DMS; 그림라)
 * 마취 : 자이진? 켈타길 10ml/두(5~10분 후 마취 개시, 30분~1시간 마취, 해독 : 폰트랄H 1.5ml 주사)
2. DMS 급여 중단일 : 2011년 9월 29일 (Lutalyse 2.0ml 근육주사, 다배관 처리시 FSH 20ml 추가 주여)
3. 인공수정 일시 : 2011. 10. 02 * 인공수정 10~12시간 전 후 GnRH 주사 (이장의 : 041-585-8250, [redacted])
4. 분만예정일 : 엘크 2012. 06. 07 (임신기간 248일 기준, 근거 Deer farm handbook, P.181), 꽃사슴 2012. 05. 15 (225일 기준시)
 * 지난도(2010년) 임신결과 : 인공수정 6두, 수정관이상 2두에서 엘크 134-자츄 생산(2011.6.11분만), 엘크124 분만시 폐사(수정관이상 자츄 생산, 2011. 6. 24)
 * 꽃사슴 마취 : <썬시콜린(50mg/ml) 4ml + 중류수 6ml + 자이진 2ml>에서 꽃사슴 우당 0.3ml(20~30분간 마취) 0.6ml(50~60분간 마취) 주사
 * MGA(melagestrolacetate) : 설관초진제(cow) : only in heifer에서만 효과적. 계속 주여시에는 LH방출억제 → 배란억제(라르메노프렐렉스제)
 * 출산비 지급 : 출산제80관, 출태율60, 출몰률30, 출산율30관 출급 지급

3 2012년도 시험 추진 내역(시험일정)

가. 2012년 사슴 자연교미를 위한 발정 및 배란 동기화 처리 방법

9월 추진 일정표 (바이오클리어(주) 제공)

일	월	화	수	목	금	토
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19 (Group 1) - RFSa 주사 : 3.5*5ml/두 (Lutalyse) - PG600 주사 - 5ml/두 (1500에 사작)	20	21 - 썬타길(GnRH) 주사 : 5ml(1병)/두 (1500에 사작)	22 - 숫사슴 합사(1차) (오전 8시 ~)
23/30	24 (Group 2) - RFSa 주사 : 3.5*5ml/두 (Lutalyse) - PG600 주사 - 5ml/두 (1500에 사작)	25 - 숫사슴 격리(1차) (오후 5시 ~)	26 - 썬타길(GnRH) 주사 : 5ml(1병)/두 (1500에 사작)	27 - 숫사슴 합사(1차) (오전 8시 ~) * 9일 후 격리(분리) (10월 1일)	28	29

- 문의 : 이장의 [redacted] 585-8250 ● 윤봉산 사슴농장(천안시 목천읍 서흥리 33-1) ● 농장주 : 김범호회장님 [redacted]
- 이장의 : [redacted] * 두렐라이스 : 1,600원/병(10ml), PG600 : 8,800원/병(5ml), 썬타길 : 19,800원/병(5ml)
- * 소요량 (14두 분량, 원래 13두분 소요) : 가구당 두렐라이스 7병, PG600 14병, 썬타길 14병 (총액 : 512,400원)

나. 사슴 난포란으로 부터 핵이식 수정란생산 계획(수정보완-최종)

2012년 10월 추진 일정표 바이오켈저(주) 작성(이강희)

일	월	화	수	목	금	토
	1	2	3	4	5	6
				역사연구소 보충	사슴정액 보존액 1차 준비(예정)	
7	8	9	10	11	12	13
				회사 설립 7주년 기념일	시와주문(면접 1) 중앙대/공북대 협의 및 협조 의뢰	중앙대: 동결능향 세포 분양 협조 의뢰
14	15	16	17	18	19	20
	역사연구소 보충	중앙대: 동결능향 세포(분양) 인수보존 (20 straws 이상)	사슴정액 보존액 2차(예정) 및 채취기 준비	사슴정액 정제보존 (2가지 처리) * GSH와 함께 5% 포도당 * 용액 정제할 때도 함께 처리	난포란배양액 제조(예정) (한국대)	
21	22	23 (Group 1)	24	25	26	27
	사슴 정액 병조 정액 (면접 후 이력/정액기 개발)	Group 1 처리 - GnRH 주사(6두) * 최타진(1.5ml) 주사 (17:30에 시작)	- CO2 Incubator 준비 : CO2 주문/예비기동	사슴정액 정제보존 (2가지 처리) * GSH와 함께 5% 포도당 * 용액 정제할 때도 함께 처리	난포란배양액 제조(예정) 박용세포로 지원 예정 게시	
28	29	30 (Group 1)	31	11/1 (Group 1/2)	11/2	11/3(토)
	공북대 농생세포 및 정액 전 달 (해양액 인수)	6두 RFSa 주사 (10시/두) * G600(4.5ml/두) 3두 주사 또는 FSH 3두 주사 (10:30에 시작)	수정유 및 약품준비	계란: 6두 (오전 9시~12시) * 채란 난자 채취성숙 (14:00~) * Group 2 (08:00~09:00시) * RFSa 주사 (1.5ml/두): 6두	Group 1 IVP(10:00~)	Group 2 * RFSa 주사 (1.5ml/두) + GnRH 주사 : 6두 (최타진 1.5ml) (08:00~09:00시)

● 사슴 발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법 :

- 1안 : GnRH 주사 ⇒ 1주일 후 RFSa + RG 600(또는 FSH) 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란(번식계절 도래시) - Group 1, Group 5
- 2안 : RFSa 주사 ⇒ 2일 후 RG 600 + GnRH 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란(번식계절 중에 실시) - Group 2, Group 3, Group 6

2012년 11월 추진 일정표 바이오켈저(주) 작성(이강희)

일	월	화	수	목	금	토
				11/1 (Group 1/2)	2	3
			난포란 배양액 제조(예정)	계란: 6두 (9시~12시) * 공북대 난자 전달 * 채취성숙(14:00시~) * Group 2 * RFSa 주사 (1.5ml/두): 6두 (6시)	Group 1 IVP(10:00~)	Group 2 * RFSa 주사 (1.5ml/두) + GnRH 주사 : 6두 (최타진 1.5ml) (08:00~09:00시)
4	5 (Group 2)	6	7	8	9 (Group 1)	10
	계란: 5두 (08:30~12:00시) * 공북대 전달(13:00까지) * 채취성숙(14:00시~)	Group 2 핵이식/IVP (10:00~)		Group 3 * RFSa 주사 (1.5ml/두): 7두 (08:00~09:00시)	IVP수정란이식 * 미채란 1두에 수정란이식(10:00시) (마취 후 비의화제)	Group 3 * RFSa 주사 (1.5ml/두) + GnRH 주사 : 7두 (최타진 1.5ml) (08:00~09:00시)
11	12 (Group 3)	13	14	15	16	17
	계란: 6두 (08:30~12:00시) * 공북대 전달(13:00까지) * 채취성숙(14:00시~)	Group 3 핵이식 및 IVP (10:00~) Group 2 (수정란인수) * 미 채란 1두에 IVP수정란 또는 핵이식 수정란이식(비의화제 09:00~)		- 산양 일식 : 12(8.2 #10)		
18	19	20	21	22	23	24
		Group 3 (수정란인수) * 미 채란 1두에 수정란 또는 핵이식수정란 이식(비의화제 09:00~)	마니제인 인수 (7두: 6월, 5두)	Group 4 (Group 1 계란준비) * RFSa 주사 (1.5ml/두): 6두 (08:00~09:00시)		Group 4 * RFSa 주사 (1.5ml/두) 2두 + FSH(1.5ml/두) 2두 / GnRH 주사 : 6두 (최타진 1.5ml)
25	26 (Group 4)	27	28	29	30	
	계란: 5두(난조 처리) (08:30~12:00시) * 공북대 전달(13:00까지) * 채취성숙(14:00시~)	Group 4 핵이식 및 IVP (10:00~)(성숙/선택 확인) Group 5 처리 ○ GnRH 주사(6두) * 최타진(1.5ml) 주사 (17:30에 시작)		역월 12월 4일(화) 이식 여부 결정		

2012년 12월 추진 일정표 (바이오벤처(주) 제공)

일	월 (Group 4)	화	수	목	금	토
	11/26 - 계관 : 6주 (09:00~12:00시) * 중독대견달(13:00까지) * 재외성숙(14:00시~)	11/27 - Group 4 피이식 및 IVF (10:00~) ○ Group 5 처리 - GnRH 주사 (6주) * 최타결(0.9ml) 주사 (17:30에 시작)	11/28 - Group 4 * 피이식 및 IVF (성공/실패 확인 후 이식 결정)	11/29	11/30	1
2	3 피이식수정란 생산의 성공/실패 확인	4 - Group 4 (수정란이식) * 피 계관 1주에 - Group 5 (G2 재처리) 6주 BCG 주사 (10:00) + PG600 (1.5ml)/주 8주 FSH 3주 주사 (10:00)	5	6 (Group 5) - 계관 : 5주 (난소적출) (오전 8시 ~) * 중독대 견달 - Group 6(G3 재처리) * FSH 주사 (10:00) 주 : 6주	7 - Group 5 피이식/IVF (10:00~)	8 Group 6 (09:00~15:00) 3주 * FSH(50) 주사 / GnRH 주사 : 6주 (최타결 1.5ml)
9	10 (Group 6) - 계관 : 4주 (난소적출) (09:00~12:00시) * 중독대견달(13:00까지) * 재외성숙(14:00시~)	11 - Group 6 * 피이식 및 IVF (10:00~)	12 - Group 5 피이식/IVF(성공/실패확인)	13 (Group 5) - 수정란 인수(Group 5) - 피 계관 1주에 수정란이식 (피외과적)	14	15
16	17	18 - Group 6 (수정란인수) * 피 계관 1주 수정란 또는 피이식수정란 이식 (외과적)	19	20	21	22
23/30	24	25	26	27	28	29

2012년 꽃사슴 시험처리 내역 (Group 1)

번호	명호 (이표)	발정동기화처리(아래만)				계관(시술시간) (08:00~12:00)		성숙 후 공시 난자수		수정란이식		비고
		10/25(화) (16:00~17:00)	특인	10/30(토) (08:00~09:00)	특인	11/1(목) 난소(난포수)반응	계관결과 (난자수)	11/2(금) (생후 2주)	11/9(금) (생후 9주)	11/16(금) (생후 16주)	11/23(금) (생후 23주)	
1	161 (261) GnRH 효타결(1.5ml)	양성	BGP 2a(1ml)+ EG800(1.5ml)	양성	파:출혈1,대2 은:대8	G: F: F:						
2	162 (262) GnRH 효타결(1.5ml)	양성	BGP 2a(1ml)+ EG800(1.5ml)		파:출8 은:출혈1,출8	G: F: F:						
3	163 (263) GnRH 효타결(1.5ml)		BGP 2a(1ml)+ EG800(1.5ml)		파:출혈1,대1,출2 은:대8	G: F: F:						
4	164 (264) GnRH 효타결(1.5ml)		BGP 2a(1ml)+ FSH(1.5ML)		파:대1 은:출1	G: F: F:					11/11 (사망)	
5	165 (265) GnRH 효타결(1.5ml)		BGP 2a(1ml)+ FSH(1.5ML)		생환시 자궁 및 난소 미정출 (7월수술로 확인)	G: F: F:					임신으로 판단(오란)	
6	166 (266) GnRH 효타결(1.5ml)		BGP 2a(1ml)+ FSH(1.5ML)		미시술							
7												
8												

<발정동기화 및 난 노포란 생산 처리방법> : Group 1 : 1안 채택

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 BGP 2a + EG800(또는 BSH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 포함)

○ 2안 : BGP 2a 주사 -> 2일 후 GnRH + EG800(또는 BSH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 중기 실시)

* 이후방법 : < 800/50mg/ml 4ml + 동류수 8ml + 자외선 2ml>에서 꽃사슴 무당 0.6ml(20~30분간 마취)~0.8ml(50~60분간 마취)

2012년 꽃사슴 시험처리 계획 (Group 2)

번호	명호 (이포)	발정동기화처리(다태란)				제한(시술시간) (06:00~12:00)		성숙 후 동시 난자수		수정란이식		비고
		11/1(목) (08:00~09:00)		11/5(토) (08:00~09:00)		11/5(월) 난자(난자수)반응	제한결과 (난자수)	11/6(월) (양수주해)		11/15(화) (양수주해)		
		확인	확인	확인	확인			확인	확인			
1	157 (257)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대4,소8 유:대1,소4	G: F: F:					
2	158 (258)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대8 유:대1,소8	G: F: F:					
3	159 (259)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대1,소2 유:대1,소2	G: F: F:					
4	160 (260)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		제한시 자궁 및 난소 미정출 (7월수술은 실시)	G: F: F:					임신으로 판단(오관)
5	161 (261)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		제한시 자궁 및 난소 미정출 (7월수술은 실시)	G: F: F:					임신으로 판단(오관)
6	162 (262)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대8 유:대4						
7												
8												* 제한시 임신으로 판단된 오류 : 방관의 용란으로 자궁 관찰 어 려움(자궁 노출 지연), 대량 - 수술 1시간 전 이포제 투약

<발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법> : Group 2: 2안 체제

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 EGF2a + EG800(또는 GnRH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 포함시)

○ 2안 : EGF2a 주사 -> 2일 후 GnRH + EG800(또는 GnRH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 중계 실시)

* 다태방법 : < 호르몬(50mg/ml) 4ml + 동류수 8ml + 자외선 2ml>에서 꽃사슴 투당 0.6ml(20~80분간 마취)~0.8ml(50~80분간 마취)

2012년 꽃사슴 시험처리 계획 (Group 3)

번호	명호 (이포)	발정동기화처리(다태란)				제한(시술시간) (06:00~12:00)		성숙 후 동시 난자수		수정란이식		비고
		11/8(목) (08:00~09:00)		11/10(토) (08:00~09:00)		11/12(월) 난자(난자수)반응	제한결과 (난자수)	11/15(화) (양수주해)		11/20(화) (양수주해)		
		확인	확인	확인	확인			확인	확인			
1	166 (266)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대2 유:대8	G: F: F:					
2	164 (264)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대8 유:대5	G: F: F:					
3	166 (266)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대8 유:대4	G: F: F:					
4	166 (266)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관:대2 유:대1,소1	G: F: F:					
5	167 (267)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관: 유:	G: F: F:					11/8 제한시 과다 다태시각
6	168 (268)	EGF2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		관: 유:	G: F: F:					11/8 과다 다태시각
7												
8												* 다태 시 의사 발생 원인 : 다태제 과다 투입, 울브르 마취, 희분제(요염빈)의 장력 과성 등으로 사료 됨.

<발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법> : Group 3: 2안 체제

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 EGF2a + EG800(또는 GnRH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 포함시)

○ 2안 : EGF2a 주사 -> 2일 후 GnRH + EG800(또는 GnRH) 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(번식계열 중계 실시)

* 다태방법 : < 호르몬(50mg/ml) 4ml + 동류수 8ml + 자외선 2ml>에서 꽃사슴 투당 0.6ml(20~80분간 마취)~0.8ml(50~80분간 마취)

2012년 꽃사슴 시험처리 계획 (Group 4)

번호	명호 (이포)	발정동기화처리(다례안)				제한(사슴사건) (08:00~12:00)		성숙 후 동시 단검수		수정란이식		비고
		11/22(목) (08:00~09:00)		11/24(토) (08:00~09:00)		11/26(월) 단검(단검수)받은	제한결과 (단검수)	11/27(화) (양후생)	12/4(목) (양후생)			
		확인	확인	확인	확인					확인	확인	
1	161 (261)	RGF2a(1ml)		RG800(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
2	162 (262)	RGF2a(1ml)		RG800(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
3	168 (268)	RGF2a(1ml)		RG800(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
4	169 (269)	RGF2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		제한 미실시	G: F: F:					후호 이식용
5	166 (266)	RGF2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
6	168 (268)	RGF2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 煮液(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
7												
8												

<발정동기화 및 다 남포란 생산 처리방법> : Group 4 처리 이후부터 (2012. 11. 16일 이후)

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 RGF2a + RG800(또는 ESH) 주사 -> 48시간 후 남포란 채취(번식계열 포함)

○ 2안 : RGF2a 주사 -> 2일 후 RG800(또는 ESH) + GnRH 주사 -> 48시간 후 남포란 채취(번식계열 중에 실시)

* 파후방법 : < 표시용량(50mg/ml) 4ml + 동류수 6ml + 자이인 2ml>에서 꽃사슴 투약 0.6ml(20~30분간 파후) <0.6ml(50~80분간 파후)

2012년 꽃사슴 시험처리 계획 (Group 5)

번호	명호 (이포)	발정동기화처리(다례안)				제한(사슴사건) (08:00~12:00)		성숙 후 동시 단검수		수정란이식		비고
		11/27(화) (08:00~09:00)		12/4(목) (08:00~09:00)		12/6(토) 단검(단검수)받은	제한결과 (단검수)	12/7(일) (양후생)	12/15(토) (양후생)			
		확인	확인	확인	확인					확인	확인	
1	167 (267)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ RG800(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					12/8 배사
2	168 (268)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ RG800(1.5ml)		과: 우:	G: F: F:					
3	169 (269)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ ESH(1.5ML)		과: 우:	G: F: F:					
4	160 (260)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ ESH(1.5ML)		과: 우:	G: F: F:					
5	161 (261)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ RG800(1.5ML)		제한 미실시	G: F: F:					후호 이식용
6	162 (262)	GnRH 煮液(1.5ml)		RGF2a(1ml)+ ESH(1.5ML)		과: 우:	G: F: F:					
7						총 81개, 80개	총 22개 성숙(71.0%)	18/22 (86.7%)		4-cell 트 2개 발달		
8												

<발정동기화 및 다 남포란 생산 처리방법> : Group 5 (Group 2 재처리)

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 RGF2a + RG800(또는 ESH) 주사 -> 48시간 후 남포란 채취(번식계열 포함)

○ 2안 : RGF2a 주사 -> 2일 후 RG800+GnRH 주사 -> 48시간 후 남포란 채취(번식계열 중에 실시)

* 파후방법 : < 표시용량(50mg/ml) 4ml + 동류수 6ml + 자이인 2ml>에서 꽃사슴 투약 0.6ml(20~30분간 파후) <0.6ml(50~80분간 파후)

2012년 꽃사슴 시험처리 계획 (Group 6)

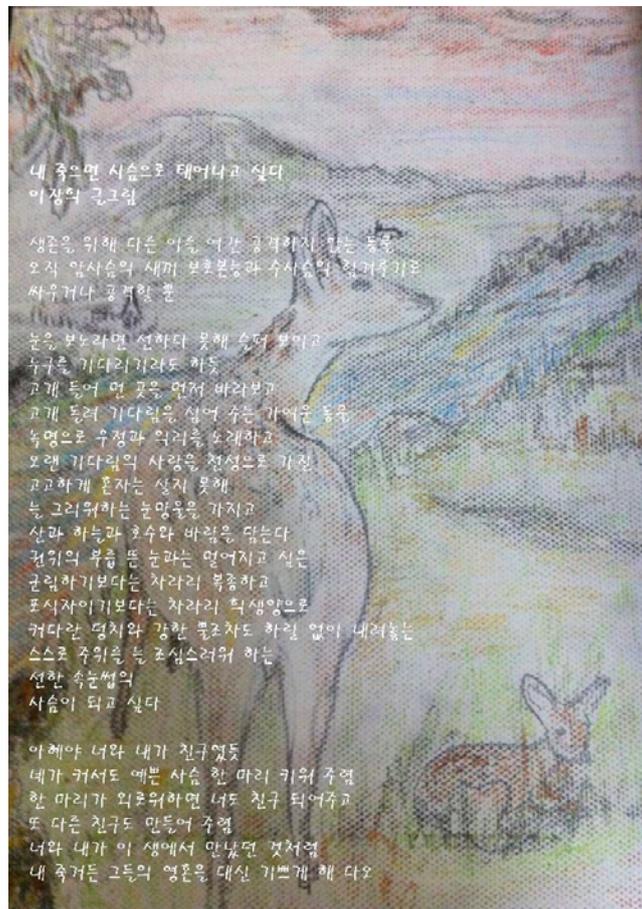
번호	명호 (이프)	발정동기화처리(다테란)				최란(시술시간) (08:00~12:00)		정숙 후 동시 난자수		수정란이식		비고
		12/6(목) (08:00~09:00)		12/8(토) (08:00~09:00)		12/10(월) 난사(난포수반응)		12/11(화) (양수추출)		12/18(화) (양수추출)		
		확인	확인	확인	확인	G: P: F:	G: P: F:	G: P: F:	G: P: F:			
1	168 (268)	RGR2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)	예사 (12/8)	(~) 과: 우:	G: P: F:					
2	164 (264)	RGR2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)	예사 (12/8)	(~) 과: 우:	G: P: F:					
3	165 (265)	RGR2a(1ml)		EG800(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		최란 미실시	G: P: F:				12/14 18:00주입 (4-cell 2개)	최과경 이식
4	166 (266)	RGR2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		(난포리출차단) 과: 우:	G: P: F:					
5	169 (269)	RGR2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		최란 미실시	G: P: F:			자궁선 취관에 삽입	12/14 12:00이식 (4-cell 2개)	최과경 이식 (178트 조정)
6	161 (261)	RGR2a(1ml)		ESH(1.5ml)+ GnRH 蒸餾水 (1.5ml)		난포리출/차단 과: 우:				정관 삽입		

<발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법> : Group 6 (Group 6 재처리)

○ 1안 : GnRH 주사 -> 1주일 후 RGR2a + EG800(또는 ESH)주사 -> 48시간 후 난포란 채취(반식계절 표본소)

○ 2안 : RGR2a 주사 -> 2일 후 EG800+GnRH 주사 -> 48시간 후 난포란 채취(반식계절 종계 실시)

* 다회양법 <복합유란(50mg/ml) 4ml+ 동류수 8ml + 자이진 2ml>에서 꽃사슴 무당 0.6ml(20~30분간 다회 : 무당 및 이프 정확 시)~0.7ml(50~60분간 다회:생환 시)



< 이장희 글.그림 >

부록 2 - 학술발표 및 특허출원(등록) 내역(사본)

< 학술 발표 내역 >

P 078

꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 배양온도가 핵이식 후 발생 능에 미치는 영향

이장희¹, 백순화², 이주형¹, 허영남³, 김남형²

¹바이오컬처(주), ²백석대학교, ³충북대학교

본 연구는 우리나라 꽃사슴의 핵이식수정란 생산 기술을 개발하기 위하여 다배란 처리 후 회수된 난포란의 체외성숙 후 핵이식 시 융합조건이 복제란의 발달능에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 꽃사슴의 핵이식란을 생산하기 위해 번식계질 중(10~12월)에 꽃사슴 19두에 대해서 PGF_{2α}(Lutalyse, 1.0 ml)를 주사하고, 2일 후 PG 600(1.5 ml)와 GnRH(퀴타길, 1.6ml)를 병용 주사한 후 48시간 파에 마취 후 수술하여 채란된 난포란을 : TCM-199에 10% FBS (v/v), 0.2 mmol/L sodium pyruvate, 25 mg/mL gentamycin sulfate, 1 mg/mL follicle-stimulating hormone (Stimufol; Meril, Lyon, France), 1 mg/mL estradiol-17b and 0.57 mmol/L cysteine이 함유된 체외성숙 배양액에 옮겨 37°C 또는 38.5°C incubator(at in an atmosphere of 5% CO₂; 95% air)에서 20시간 성숙시킨 후 데미콜신을 30분 동안 처리하여 난구세포를 제거한 후 제핵하고 녹용 세포핵을 융합시켜 융합율과 발생능을 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Developmental rate of NT embryos on the temperature of incubation

	No. of EN oocytes	No. of fused oocytes (%)	No. of cleaved embryos (%)	4-Cell (%)
37 °C	9	8 (90.0) ^a	6 (75.0%) ^a	1 (16.7) ^a
38.6 °C	21	20 (96.2) ^b	16 (76.0%) ^a	10 (62.5) ^b

본 연구 결과, 꽃사슴 핵이식수정란을 생산하기 위한 배양온도가 각각 37°C 및 38.5°C 일 때 융합율과 난합율은 각각 유의적 차이가 없었지만 (90.0% vs 96.2%; 75% vs 75%), 4세포기 배아의 발달율에서는 38.5 C 조건에서 현저하게 높았다(16.7% vs 62.5%). 연구 결과, 얻어진 4세포기 복제란은 발정 동기화된 2두의 꽃사슴에게 각각 2개씩 외과적 및 비외과적으로 각각 이식하였다.

* 본 연구는 2010년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제번호 : 110-026-03-3-SB010).

Key words) Deer, Estrus synchronization, Superovulation, Ovum, Ovary reaction

E-mail: bio-culture@hanmail.net

포사송 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 온도조건에 핵이식 후 발생능력 미치는 영향

박정현¹⁾, 박소연²⁾, 허주영³⁾, 권영남⁴⁾, 김남현⁵⁾
 1) 동해수산연구소(경북), 2) 경북대학교, 3) 경북대학교, 4) 경북대학교, 5) 경북대학교

대한수산생식과학잡지(경북), 2012, 6, 20~24

서론

이 연구는 부리나래 복제수정란 핵이식수정란 생산 기술을 개발하기 위하여 다배양 장치 후 포수의 나포양막 형성율은 핵이식 시 발란조건이 수정란의 발생능력 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료및방법

복제수정란 핵이식장를 생산하기 위한 배식계정 물(10~12 배)에 포사송 18두를 대량서 PGF2 α (Lily lysa, 1.0n)를 주사하고 2배 후 PG 600(1.5n)의 GRH(허타리, 1.5n)를 배양 주사한 후 48시간 배양 마져 후 수송하여 정란(Fig. 1)의 나포양막 TCM-100H 10% FBS (v/v), 0.2 nmol/L sodium butyrate, 25 nmol/L actinomycin D(Sigma), 1 nmol/L follicle-stimulating hormone (Sigma), 1 nmol/L estradiol-17 β (Sigma) 0.57 nmol/L cysteine이 함유된 정란액은 배양 마져 38.5 $^{\circ}$ C incubation(5% CO $_2$, 95% air)에서 20시간 배양(Fig. 2)시린 후 대미로 신킨 30분 배양 장치하여 난구세포를 제거한 후 정제하고 5%의 RH(jovea mesoclym) 무척 세포액을 배양시켰다. 배양 시 온도조건을 37.0 $^{\circ}$ C 및 38.5 $^{\circ}$ C로 하여 정란을 남가해 온비의 세포액을 배양(Fig. 3)시켜 6일 간 배양하였다.



Fig. 1. 포사송의 다배양 장치 마져의 배수(배양액 수송 및 정제)

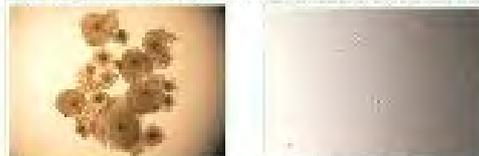


Fig. 2. 포사송의 정란배양시 나포양막(2배)과 고해액(무, 5% FBS)의 배양



Fig. 3. 고해액 마져의 핵이식 후 배양(배양액)의 핵이식 마져

이 연구는 2012년도 국립수산물품질관리원 연구개발사업(연구과목: 수산생식)에 의해 수행되었으며(연구과목번호: 1)0025-02-2-000)이다.
 (과제명: 무척추 수산생식기술 이종화 실용화실용화의 실용화 인지도 제고와 실용화 기술)

결과

FBS를 다배양 장치의 배양액에 20시간 배양시린 후 대미로 신킨 장치하여 난구세포를 제거한 후 정제하고 5% 세포액에 37.0 $^{\circ}$ C 및 38.5 $^{\circ}$ C 온도에서 배양시린 후 각각 0배 및 2배 배양시린 후 배양마져 6일 간 배양하여 발생능력 조사를 결과는 Table 1과 같았으며, 배양시린 후 시린 배양액의 배양 3일째 및 4일째의 핵이식 수정수정란은 Fig. 4와 같았다. 배양 2일째 4-cell 수정란을 비발생액 및 발생액에 이식하였다(Fig. 6).

Table 1. Developmental rate of RT on eggs of the fertilization of fertilization.

	No. of RT oocytes	No. of fixed oocytes (%)	No. of closed oocytes (%)	4-Cell (%)
37.0 $^{\circ}$ C	0	0 (0.0%)	6 (75.0%)	1 (16.7%)
38.5 $^{\circ}$ C	21	20 (95.2%)	16 (75.0%)	10 (52.4%)

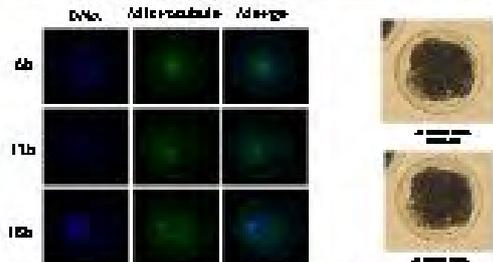


Fig. 4. 배양 후 배양액 고해액 및 미세소관 형성액의 배양된 4 세포가 핵이식 수정수정란



Fig. 5. 포사송 핵이식 수정란의 배양액에 배양액에 하여 (2012. 12. 14)

결론

복제수정란 핵이식수정란 생산하기 위한 배양조건은 37.0 $^{\circ}$ C 보다 38.5 $^{\circ}$ C가 배양률이 높았다(16.7% vs 52.4%). 나포양막에서는 두 장치 간에 유의적 차이가 없었다(75.0% vs 75.0%).

본 연구는 국립수산물품질관리원 연구개발사업(연구과목: 수산생식)에 의해 수행되었으며(연구과목번호: 1)0025-02-2-000)이다.
 (과제명: 무척추 수산생식기술 이종화 실용화실용화의 실용화 인지도 제고와 실용화 기술)



사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향

이창희¹, 백순화², 이주형¹, 김기중³, 류범용³, 박성재⁴, 여태명⁴, 심호섭⁵, 이종원⁶¹바이오킬쳐(주), ²백석대학교, ³중앙대학교, ⁴국립축산과학원, ⁵단국대학교, ⁶공주대학교

본 연구는 사슴 인공수정과 핵이식수정란 생산 기술을 개발하여 가량 및 번식 효율을 개선하기 위해 발정동기화 및 성선자극호르몬란 처리가 난포란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 사슴의 스트레스를 줄이기 위한 발정 동기화 방법으로 엘크 12두에 대해서 MEGA-100 (Melangesterolacetate)을 1일 1회(오전 급이 시) 두당 2.5 g씩, 꽃사슴의 경우에는 12두에 대해서 DMS(Dimethylbesterol)를 1일 1회 두당 2.0 g씩 섭취될 수 있도록 자가 배합 TMR 사료에 혼합하여 급여개시일로부터 20일간 급여 후 중단하고 익일 발정을 유도하기 위하여 엘크는 두당 PGF₂α(Lutalyse) 5ml를 주사한 직후 난포란 대량 생산을 위해 엘크 6두에 대해서는 FSH(Foliotropin V) 3ml 또는 PG600(PMSG 400IU+hCG 200IU) 5ml를 주사하였으며, 꽃사슴 6두의 경우에는 엘크의 1/2 수준의 호르몬을 투여하였다. 호르몬 투여 후 48시간째에 마취하여 복부를 절개한 후 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난포수를 조사하고 난포에 주사침(19G)을 찔러 올입을 작용시켜서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 배양액(H199-10)에 세척한 후 현장에서 현미경으로 수집하여 난포란의 등급별로 수를 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Rate of Recovery and Number of Follicle on Treatment of Gonadotropin for production of Nuclear Transferred Embryos in Deer

Hormone	Elk						Flower Deer					
	No. of follicles (M±SD)	No. of recovered ovum				Recovery (%)	No. of follicles (M±SD)	No. of recovered ovum				Recovery (%)
		G	F	P	Total			G	F	P	Total	
FSH	42 (7.0±3.9)	12	12	4	28	66.7	71 (11.8±7.2)	30	10	16	56	78.9
PG600	25 (4.2±2.4)	7	7	2	16	64.0	43 (7.18±4.3)	17	6	9	32	74.4

발정동기화 처리 후 다수의 난포란 생산을 위해 성선자극호르몬으로 FSH 및 PG600를 처리한 결과 난포란의 회수율은 FSH(66.7~78.9%) 처리가 PG600(64.0~74.4%) 처리보다 다수의 난포 발달에 다소 유리하였다.

Key words) deer, estrus synchronization, follicle, ovum, ovary reaction

본 연구는 2010년도 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제관리번호: 110025-3).

사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발

이장희¹, 박순화², 이주형¹, 류범용³, 김기중³, 김용희², 박성재⁴, 허태영⁴, 정영훈⁴, 심호섭⁵¹바이오컬처(주), ²육식대학교, ³중앙대학교, ⁴국립축산과학원, ⁵단국대학교

본 연구는 사슴의 수정란이식 및 핵이식기술을 개발하여 개량과 동시에 번식 효율을 개선하고자 하였다. 이를 위하여 사슴의 발정동기화, 다배란처리, 난자 회수, 체세포배양, 수정란 이식, 핵이식, 핵이식수정란이식을 실시하였으며, 본 연구에서는 다배란 처리 후 회수된 난자에 대해 제핵과 융합 및 핵이식 수정란 생산에 미치는 다배란 처리방법과 핵이식수정란 생산기술 및 비외과적 수정란이식 기술을 확립코자 엘크 및 꽃사슴 각각 4두에 대해서 발정동기화 및 다배란 처리(이 등, 2010)을 실시하고, 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 발정 및 다배란 처리를 위하여 엘크의 경우에는 CIDR (Pfizer New Zealand Ltd., NZ)를, 꽃사슴의 경우에는 Ring-CIDR(바이오컬처(주), 한국)를 14일 동안 질 내에 장치하고, 제거한 후 PG600(hCG 200IU + PMSG 400IU, Intevet, Holland)를 근육주사하고 PGF_{2α}(25mg/두)과 FSH (200mg/두, 24시간 간격으로 2회 주사)를 주사하여 발정 및 다배란을 유도하였다.

다배란 처리된 엘크 및 꽃사슴의 난소 반응조건으로 채란된 난포란 수 및 수정란 수는 FSH로 배란 처리 후 48시간 후에 엘크 및 꽃사슴 2두로부터 채란된 난포란의 수는 각각 평균 9.0 및 8.5개 이었다. 나머지 각각 2두는 인공수정하여 수정 후 7일째 외과적으로 수정란을 회수한 결과, 각각 평균 2.5 및 3.0개의 수정란을 회수하였다. 채란된 난자는 IVM medium에서 24시간 배양하였으며, 체외 성숙율은 약 20% 정도였다.

체외 성숙된 난자는 엘크의 경우에는 18개의 난포란 중 6개가 MII 단계에 도달하였으며, 제핵 후 귀세포로 핵이식한 결과 1개가 융합되었으나 발생되지는 못하였다. 꽃사슴의 경우에는 17개 중 7개가 MII 단계에 도달하였으며, 제핵 후 귀세포로 핵이식한 결과 1개가 융합되었으나 역시 발생되지는 못하였다.

이러한 결과는 사슴 수정란 및 핵이식수정란 생산에 있어서 난포란의 체외배양시스템에 다소 문제가 있었던 것으로 사료되었다.

Key words) Deer, Superovulation, Ovum, Embryo, Nuclear transfer

* 본 연구는 2010년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제접수번호 : 20100327).

녹용세포의 효율적인 체외배양시스템 개발에 관한 연구

김기중¹, 이용안¹, 김방진¹, 김용희¹, 하승정¹, 이주형², 이장희², 류범용^{1,*}

¹중앙대학교 동물자원과학과, ²바이오컬처(주)

녹용은 사슴의 뿔이 딱딱하게 각질화 되기 전의 뿔로서, 1년에 한번 밖에 생산할 수 없으며, 그 생산량도 매우 한정적이다. 따라서 제한적인 녹용의 수적 다량 확보를 위하여 세포 단계에서의 배양을 위한 체외배양 시스템 개발이 절실하다. 본 연구는 녹용세포의 체외배양 및 증식을 위하여 다양한 배양 조건을 변화시킴으로써 최적의 녹용세포 배양 시스템 기법을 개발하기 위해 수행하였다.

초기 녹용의 생장 2~3 개월 후 사슴으로부터 외과적 수술을 통하여 녹용을 채취하고, 녹용세포의 효율적인 회수를 위하여 효소(Collagenase IV, hyaluronidase, trypsin)와 Percoll의 밀도차를 이용하여 순수도 높은 녹용세포를 분리하였다. 또한, 체외배양조건을 확립하고자 배양환경(세포 배양액, 혈청, 온도 변화, 산소 농도, 성장인자 등) 변화에 따른 녹용세포의 배양 및 증식양상을 관찰하였다. 다양한 세포배양액의 효과를 검증한 결과 생존율은 92.3~99.7%로서 처리군간 큰 차이를 보이지 않았으나, 3주간 배양 동안 가장 높은 세포 증식율(741.9배)을 나타냈던 MSC 배양액을 기본 배양액으로 선별하였고, 기본배양조건(MSC 배양액+10% FBS, 37℃, 5% CO₂, 20% O₂)을 설정하여 배양환경 변화에 따른 세포증식 정도를 분석하였다.

FBS의 첨가 농도에 따른 처리효과를 검증한 결과 기본배양조건(10%) 대비 0% 0.4 배, 5% 0.5 배, 20% 1.2 배로 첨가 농도가 증가할수록 세포증식정도가 높게 관찰되었으나, 기본배양조건과 20% 처리군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 사슴 혈청(Deer serum)의 경우 기본배양조건(10% FBS) 대비 5% 0.4 배, 10% 0.5 배, 20% 0.4 배, 배양기내 온도 처리 효과는 기본배양조건(37℃) 대비 35℃ 0.4 배, 39℃ 0.5 배, 산소 가스 농도 변화는 기본배양조건(20%) 대비 5% 0.1 배, 10% 0.3 배의 결과로서 추가적인 증식효과는 나타나지 않았다. 그러나 세포성장인자의 처리 효과 검증 결과 기본배양조건(Control, 성장인자 비치리군) 대비 CSF-1(10 ng/ml), bFGF(10 ng/ml), EGF(20 ng/ml), 병합(CSF-1 + bFGF + EGF) 처리군에서 각각 녹용세포의 증식 정도가 1.1 배, 4.2 배, 1.2 배, 5.6 배 증가된 결과로서 bFGF 및 병합 처리군에서 세포의 증식 정도가 유의적으로 높게 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 녹용세포의 체외배양을 위하여 다양한 배양조건들을 검증한 결과, MSC 배양액에 10% 우태아혈청과 bFGF(10 ng/ml)를 첨가하고 37℃, 5% CO₂, 20% O₂ 조건하에서 녹용세포를 배양하였을 때 유용한 증식효과가 나타났으며, 본 연구에서 개발된 배양 방법은 향후 녹용의 체외대량생산에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Key words) 사슴, 녹용, 녹용세포, 체외배양

[본 연구는 농림수산식품부 농림기술연구개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임(과제번호 : 110025-03-1-HD110).]

녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발

김기춘¹, 이용안¹, 김방진¹, 김용희¹, 정미선¹, 이주형², 이장희², 류범용^{1*}

¹중앙대학교 동물자원과학과, ²바이오컬처(주)

본 연구는 체외배양을 통하여 증식된 녹용세포를 대상으로 녹용세포의 동결보존 효율성을 증진시킬 수 있는 방법을 개발하기 위하여 수행하였다.

초기 녹용의 생장 2~3 개월 후 사슴으로부터 외과적 수술을 통하여 녹용을 채취하고, 녹용세포의 회수를 위하여 효소(collagenase, hyaluronidase, trypsin-EDTA)와 Percoll의 밀도차를 이용한 원심분리법을 통하여 순수도 높은 녹용세포를 분리하였다. 분리된 녹용세포는 대량 회수를 위하여 배양접시 위에서 MSC(Mesenchymal Stem Cells) 배양액에 10% 우태아혈청 (FBS)을 첨가하였고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 체외 배양하였다. 대량 증식된 녹용세포는 trypsin 처리를 통해 단일세포로 회수되었고, 0.1 × 10⁶ cells/ml의 농도로 동결보존액에 부유한 후 완만동결법을 통해 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였으며, 동결 2~3시간 후 용해 전까지 액체질소에 보관하였다. 용해 방법으로는 급속 용해법을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 기본 동결배양액으로서 MEM-β (Minimum Essential Medium alpha) 배양액에 10% FBS를 첨가하여 준비하였고, 선행 연구를 통해 세포 동결에 효율적이라고 알려진 동결보존제를 각각 첨가하여 동결 용해 후 생존율과 회수율을 측정하였다. 기본 동결배양액에 침투성 동결보존제(permeable protectant)인 DMSO, Glycerol, Ethylene glycol, 1,2-Propanediol을 각각 10%씩 첨가한 결과, 각 처리군은 83.4 ± 0.0%, 69.0 ± 0.1%, 64.3 ± 0.0%, 69.5 ± 0.0%의 생존율과 68.7 ± 0.1%, 31.7 ± 0.0%, 54.7 ± 0.1%, 51.0 ± 0.0%의 회수율을 각각 보였으며, 유의적으로 높은 효과를 보인 침투성 동결보존제는 DMSO로 나타났다. 또한 DMSO 처리군은 동결 용해 후 체외배양에 있어서 가장 높은 세포 증식율을 보였다. 녹용세포 동결보존의 효율성 증진을 위하여 동결보존효율이 가장 높았던 침투성 동결보존제인 DMSO를 녹용세포 동결보존을 위한 기본 침투성 동결보존제로 사용한 후 다양한 비침투성 동결보존제의 동결 효율을 측정하였다. 비침투성 동결보존제(non-permeable protectant)로서 Trehalose(200 mM), PEG(2.5%), Sucrose(200 mM), Catalase(100 μg/ml)을 각각 처리한 결과 93.6 ± 0.0%, 86.7 ± 0.1%, 87.6 ± 0.0%, 79.3 ± 0.1%의 생존율과, 78.0 ± 0.0%, 75.9 ± 0.1%, 70.6 ± 0.1%, 55.4 ± 0.1%의 회수율을 보였으며, 유의적으로 높은 효과를 보인 비침투성 동결보존제는 trehalose로 나타났다. 또한 trehalose 처리군은 동결 용해 후 체외배양에 있어서 가장 높은 세포 증식율을 보였다.

본 연구에서 녹용세포의 효율적인 동결보존기법을 개발하기 위하여 다양한 동결보존 조건을 검증한 결과 최적의 동결보존 방법은 MEM-β 배양액에 10% FBS, 10% DMSO, 200 mM Trehalose를 동결보존액으로 사용하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 순수한 녹용세포를 대상으로 연구하였으므로 녹용세포에 최적화된 동결보존기법을 연구한 결과로서, 본 연구에서 개발된 동결기법은 향후 녹용세포의 장기간 보존법 개발 연구에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Key words) 사슴, 녹용, 녹용세포, 동결보존

[본 연구는 농림수산식품부 농림기술연구개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임(과제번호 : 110025-03-1-HD110).]

사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향

이장희¹, 백순화², 이주형¹, 류범용³, 박성재⁴, 허태영⁴, 정영훈⁴, 심호섭⁵¹바이오컬처(주), ²백석대학교, ³중앙대학교, ⁴국립축산과학원, ⁵단국대학교

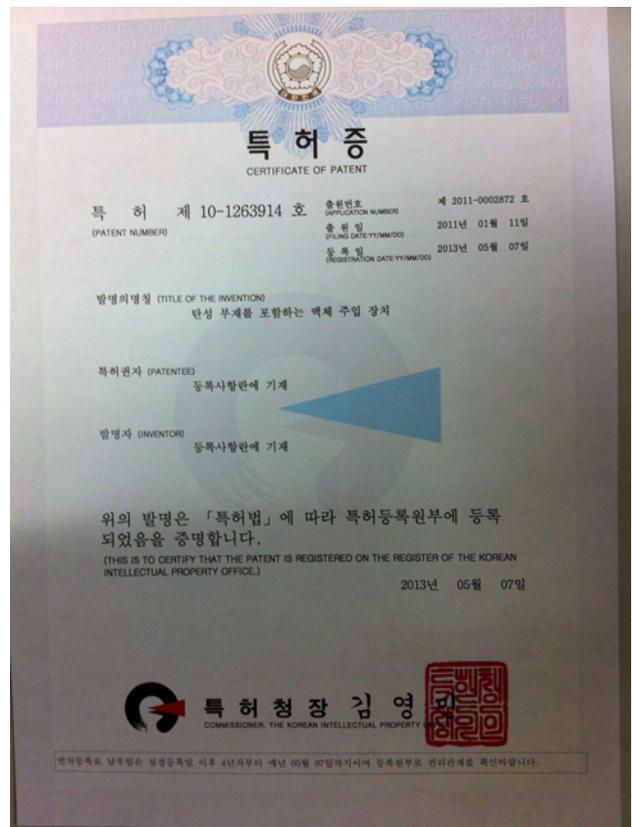
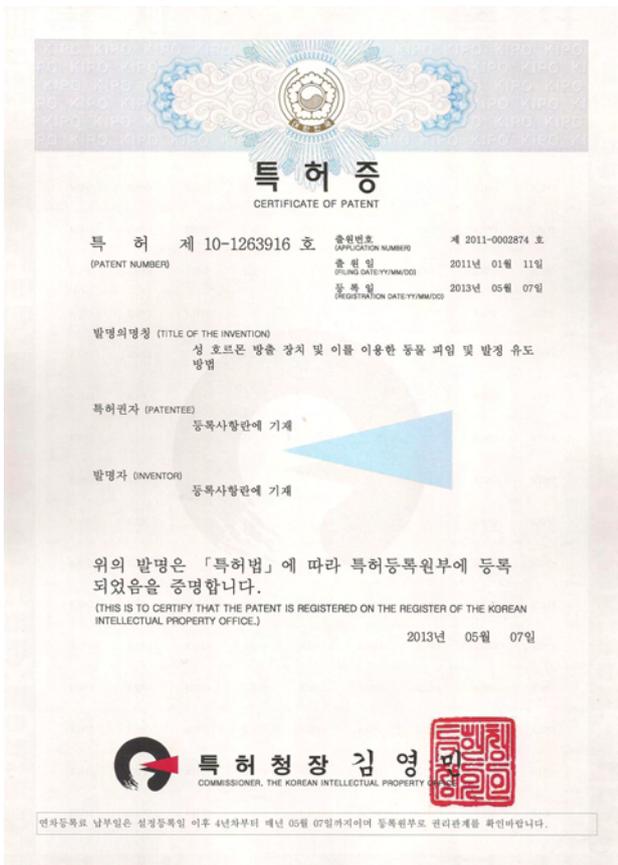
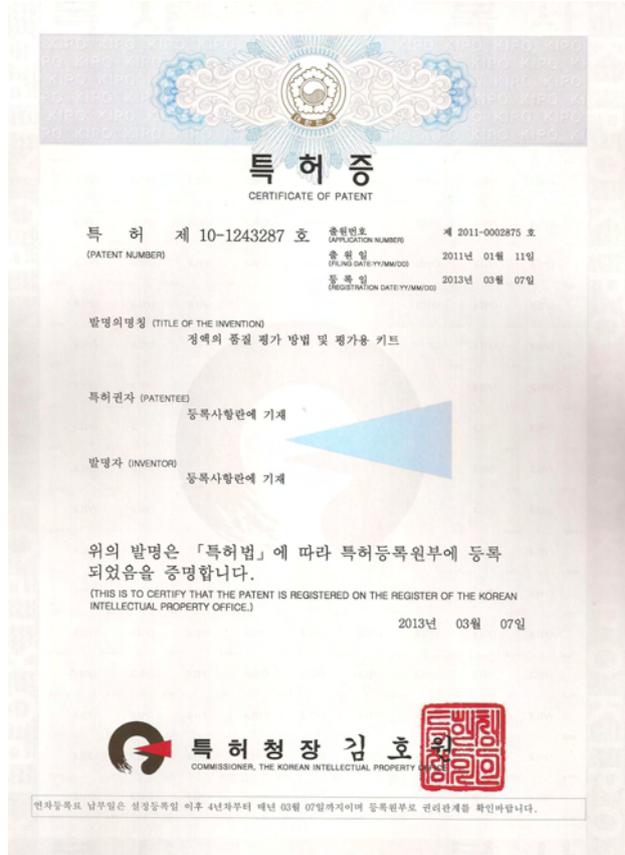
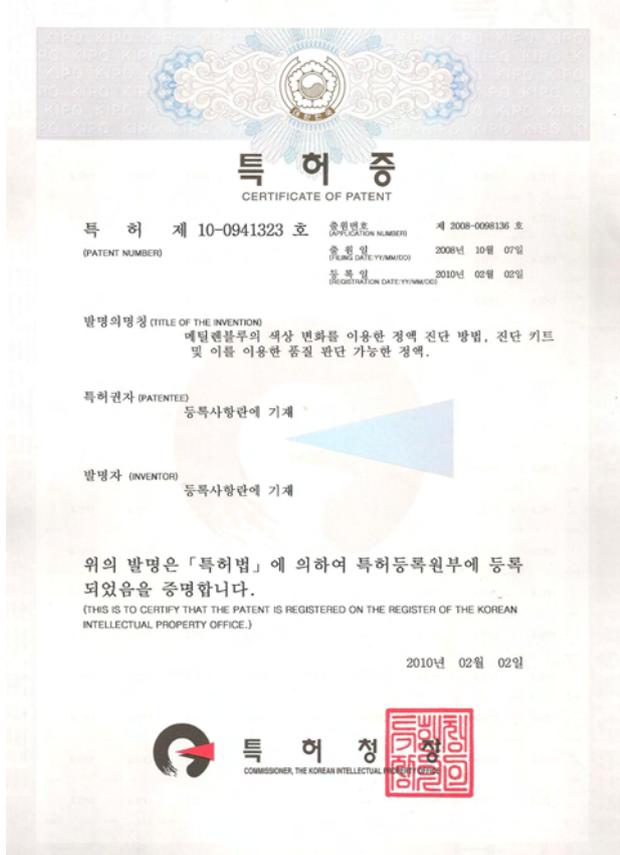
본 연구는 사슴 인공수정과 수정란이식 및 핵이식기술을 개발하여 번식 효율을 개선하고자 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. CIDR 처리에 의한 보정 스트레스를 줄이기 위하여 발정억제제의 급이식 투약법으로 발정을 동기화시키기 위하여 엘크 12두에 대해서 MEGA-100(Melangesterolacetate)을 1일 1회(오전 급이 시) 두당 2.5 g씩 섭취될 수 있도록 자가 배합 TMR 사료에 혼합하여 급여개시일(2011. 9. 8)로부터 20일간 급여 후 중단하고, 익일 발정을 유도하기 위하여 두당 PGF₂α (Lutalyse) 5 ml 및 PG600(PMSG 400 IU + hCG 200 IU) 5 ml를 각각 주사하였으며, 다배란 및 수정란 회수를 위해서는 4두에 대해서 각각 두당 FSH 3.0 ml를 추가로 주사하였다. 꽃사슴의 경우에도 12두에 대해서 DMS(Dimethylbesterol)를 1일 1회 두당 2.0 g씩 사료에 첨가하여 급여하여 동기화시켰으며, 발정 및 다배란 유도처리방법은 엘크의 1/2 수준의 호르몬을 투여하였다. 발정동기화 및 다배란 처리 방법이 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 PGF₂α 및 PG600 주사 후 48시간째에 마취하여 복부를 절개한 후 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난소 표면의 난포에 주사침(19G)을 찔러 음압을 작용시켜서 채란하였으며, 채란된 난자는 배양액에 세척한 후 현장에서 현미경으로 난자를 채집하여 난소 반응 및 난자수를 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같았다.

FSH로 배란 처리 후 48시간 후에 엘크 및 꽃사슴 4두로부터 채란된 난포란의 수는 각각 평균 2.5 및 9.8개였으며, Fair 이상의 난자 수는 각각 10개 및 3개로 엘크가 꽃사슴보다 양호하였다. 급이식 발정동기화 처리 방법으로는 MEGA-100 및 DMS 처리가 전년도의 삼입식 발정동기화처리와 유사한 성적을 나타내었다. 다배란 처리방법으로는 PG600보다 FSH가 다소 효과적으로 나타났다.

Key words) deer, estrus synchronization, superovulation, ovum, ovary reaction

[본 연구는 2010년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제관리번호 : 109008-03-1).]

< 특허출원(등록) 내역 >



부록 3 - 연구개발보고서 초록 및 연구성과활용결과 보고서

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 우수 사슴녹용세포를 이용한 생리활성물질의 생산과 핵이식 수정란이식 기술 개발				
	(영문) Development of technique of nuclear transferred embryo transfer and production of physiological activity material using velvet cell of deer				
주관연구기관	바이오컬처(주)		주 관 연 구 자	(소속) 바이오컬처(주)	
참 여 기 업	바이오컬처(주)		책 임 자	(성명) 이 장 희	
총연구개발비 (600,000천원)	계	600,000	총 연구 기간	2010. 7. 1~ 2013. 6. 30 (3년)	
	정부출연 연구개발비	450,000	총 연 구 참 여 수	총 인원	42
	기업부담금	150,000		내부인원	21
	연구기관부담금			외부인원	21

■ 연구개발 목표 및 내용

본 연구에서는 국내 우수 사슴의 활용을 통하여 첨단 생명공학기법을 통한 사슴의 녹용세포의 체세포 배양과 핵이식 수정란의 생산과 이식 기술을 적극 개발하여 다음의 연구 내용으로 국내 사슴 자원을 이용한 고부가가치 산업기반을 구축하고자 하였음.

- 사슴의 유전자원 동결보존기술개발
- 유용 체세포의 체외배양 기술 확립(세포 biopsy 및 이식기술 확립)
- 녹용 세포의 내분비학적 기전 규명
- 녹용세포를 이용한 핵이식 수정란 생산기술 확립
- 초음파기 및 내시경을 이용한 체내 수정란 채란 및 이식기술 개발
- 번식제어 용품 개발을 통한 번식 및 개량기술 개발
- 녹용 및 육경세포의 동종 및 이종간 이식 및 발생기술 확립

■ 연구결과

- 녹용 및 육경세포를 이용한 핵이식 수정란의 생산 및 이식
 - 2품종(엘크 및 꽃사슴)으로부터 난포란 채란 및 복제 수정란 생산 및 이식(4두)
 - 수정란이식 자육 생산(엘크 1두, 꽃사슴 1두는 폐사)
- 특허 등록 및 시작품 제작 : 출원 4건(국제2, 국내2), 등록 1건
 - 탄성부재를 이용한 액체주입장치(특허등록 : 제 1263914 호, 2013.05.07)
 - 탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기 (특허출원 : 10-2013-0069974, 2013. 6.18)
 - Method for the assessment of a semen quality and kit for the same(국제특허출원) (중국 201210083488.X, 2012. 3. 27)
 - 녹용세포로부터 생산되어지는 물질의 생리활성 검증 및 다양한 조직 특이세포주를 확립 함 (동결보존 및 분양 : 2품종 세포주 6종)
- 논문게재 2편(1편 예정), 학술발표15편, 홍보 9건

■ 연구성과 활용 실적 및 계획

- 활용 실적
 - 논문 발표 : SCI급 1편, 비SCI급 1편, 학술발표 15편
 - 특허 출원/등록 : 출원 4건(국제출원2, 국내출원2), 등록 1건
 - 홍보 실적 : 박람회출전 3회, 박람회 참관 3회, 학술대회 발표 3회
 - 수상 실적 : 국제발명진흥대회 금상1, 은상1, 천안시장 표창장, 우수 포스트 발표상, 농업과학기술대상 장관상
- 활용 계획
 - 자체 사업화(상품화) 계획 : 2(자체 기술 이전)
 - 교육·지도 계획 : 2 건(농가 지도 2)
 - 홍보 계획 : 1 (전시회 참가)
 - 특허 출원/등록 : 출원 4건(국제출원2, 국내출원2), 등록 2건
 - 전 축종(소, 말, 산양, 돼지 등) 대상 복제동물 생산기술 확립

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	생명산업기술개발	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	110025-03-3-SB010
연구과제명	U-기반 실시간 모니터링 및 바이오 센싱을 이용한 동물 번식관리 시스템 개발				
주관연구기관	바이오컬처(주)				
연구담당자	주관연구책임자	이 장 희			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
연구기간	총 기간	3년	당해년도기간	2011.4.10 ~ 2012.4.9	
연구비(천원)	총 규모	320,400	당해년도규모	106,800	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

본 과제 연구가 착수된 후 국내 다른 기관(국립축산과학원)에서 이와 유사한 연구가 진행되어 연구의 필요성은 경미하게 감소된 듯 하나 신규 연구의 인식은 많이 확산되어 오히려 선의의 경쟁과 연구 효과가 확산된 것으로 사료 됨

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

- 연구 수행과정에서 발생하는 불상사에 대한 안전 및 보상(보험)제도 마련 필요.
- 연구결과의 사업화 연계 지원 확대 필요

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

만족 보통 미흡

(근거 : 당초 예상했던 성과 외의 성과도 이루어졌음)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	바이오컬쳐(주)	대표이사	이 장 희 (인)
참여기업 대표	바이오컬쳐(주)	대표이사	이 장 희

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	축산(BT)	
연구과제명	우수 사슴녹용세포를 이용한 생리활성물질의 생산과 핵이식 수정란이식 기술 개발			
주관연구기관	바이오컬처(주)	주관연구책임자	이 장 희	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000	150,000	()	600,000
연구개발기간	2010. 7. 1 ~ 2013. 6. 30			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 정성적 목표량	- 녹용의 생리활성물질의 탐색 및 규명 미흡
② 당초 성과목표량	- 당초 성과 목표량을 충실히 달성 함
③	

* 평가 결과에 대한 의견

2. 의견

연구과제계획서상의 연구	정량적 평가 기준은 계획대비 충실히 수행한 것으로 판단됨. 그러나 정성적 기준에서는 많은 부분이 부족해 보임. 생리활성 물질 물질의 탐구가 없었으며, 생산된 실적을 발견할 수 없다. 수정란의 생산과 이식의 시도는 있었지만 수정란으로부터 태어난 자손을 생산을 확인할 수 없었다. 따라서 정성적 평가 부분에 많은 점수를 줄 수 없다.
산업적 성과	생리활성물질에 대한 과학적인 규명이 없었습니다. 녹용의 생리활성 물질의 탐색과 생산에 대한 연구내용 이행이 미진함.
과학기술적 성과	해당사항 없음 해당사항 없음. 해당 사항 없음.
본 과제 성과활용에 대한	해당사항 없음 해당사항없음 사슴 수정란의 체외배양에 대한 기초 연구가 추가적으로 진행되어야, 핵이식 수정란의 효율적인 생산이 가능함.
불량 및 매우불량으로 평가	해당사항 없음 본 과제 성과활용에 대한 복제 수정란에 대한 ET 하기 전에 검증이 먼저 있어야 할것 같습니다 해당 사항 없음.
최종보고서의 수정, 보완	녹용의 생리활성 물질의 탐색과 생산에 대한 연구 진행이 계획 대비 너무 미진함. 산업화를 통한 기대효과에 대한 수치부분에 대한 결과는 있는데 이수치가 어떤 근거로 나왔는지 보완 부분이 있었으면 좋겠습니다. 최종적인 핵이식 수정란 이식 결과를보고서에 추가할 필요가 있음.

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	사슴 인공수정, 수정란이식 및 복제수정란생산과 이식 기술 및 관련 특허기술
②	녹용 세포배양을 통한 생리활성물질의 대량 생산 기술
③	

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책자료	기타
①의 기술	v	v				v	v	v		
②의 기술		v			v					
③의 기술										
⋮										

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	자체 기술이전 - 복제수정란 생산기술을 타 동물로 확대 가능, 상품화
②의 기술	자체 기술이전
③의 기술	
⋮	

6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명			
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2년	실용화예상시기	2015년
기술이전 시 선행조건	주관연구기관의 변경 승인 요청 및 승인 획득		

* 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

** 기술이전시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

*** 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

[별지 34]

연구성과활용결과보고서

※ 작성요령 : 해당되는 항목은 빠짐없이 기록하되 란이 부족하면 별지작성 가능

※ 첨부 : 전문기관 요청 시 증빙자료 사본 제출

※ 분 양식을 기준으로 하되, 전문기관의 홈페이지를 통한 DB 입력을 원칙으로 함

연구과제명	우수 사슴녹용세포를 이용한 생리활성물질의 생산과 핵이식 수정란이식 기술 개발					
주관연구기관	바이오컬처(주)	주관연구책임자	이 장 희 (인) (전화 : 010-0000-0000)			
참여기업	바이오컬처(주)	총 연구기간	2009. 4. 10 ~ 2012. 4. 9 (3년 월)			
연구개발비 (천원)	계	600,000	총 참여연구원 수 (명)	총 인원	42	
	정부출연 연구개발비	450,000		내부인원	21	
	기업부담금	150,000		외부인원	21	
	기타					
연구목표 (200자 이내)	본 연구에서는 국내 우수 사슴의 활용을 통하여 첨단 생명공학기법을 통한 사슴의 녹용세포의 체세포 배양과 핵이식 수정란의 생산과 이식 기술을 적극 개발하여 다음의 연구 내용으로 국내 사슴 자원을 이용한 고부가가치 산업기반을 구축하고자 하였음.					
주요 연구내용 (500자이내)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹용 및 육경세포를 이용한 핵이식 수정란의 생산 및 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 2품종(엘크 및 꽃사슴)으로부터 난포란 채란 및 복제 수정란 생산 및 이식(4두) - 수정란이식 자육 생산(엘크 1두, 꽃사슴 1두는 폐사) ○ 특허 등록 및 시작품 제작 : 출원 4건(국제2, 국내2), 등록 1건 ○ 녹용세포로부터 생산되어지는 물질의 생리활성 검증 및 다양한 조직 특이 세포주를 확립 함(동결보존 및 분양 : 2품종 세포주 6종) ○ 논문게재 2편(1편 예정), 학술발표15편, 홍보 9건 					
연구결과 및 결과별 활용가능영역	* 주요활용가능영역(이 과제의 주요활용가능 영역 1가지만 선택하세요)					
	<input checked="" type="checkbox"/> 산업화활용 <input type="checkbox"/> 교육,지도 활용 <input type="checkbox"/> 정책활용					
	번호	연구결과	활용가능영역	활용년도		
	1	산업재산권	상품화	2015년		
연구성과 활용	연구성과활용 총괄 (해당되는 모든 란 기재)					
	기술거래	사업화	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용
	2건(예정)	1건	건	건	1건	건
	특허	논문	학술대회 발표	홍보(수상)실적	전시회참가	기타 홍보
	5건 (국내 : 3건) (국외 : 2건)	2건 (국내 : 1건) (국외 : 1건)	15건 (국내 : 15건) (국외 : 건)	5건 (국내 : 5건) (국외 : 건)	6건 (국내 : 3건) (국외 : 3건)	3건
	연구성과 활용에 따른 예상 기대효과 (200자 이내)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹용세포의 체외배양-증식에 의한 생리활성물질 생산기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 녹용이용 건강보조식품 개발(녹용분말, 녹용환, 녹용엑기스 등) ○ 사슴 수정란이식기술 보급확대로 인한 농가 수준의 개량기반 확립 ○ 핵이식 수정란의 이식기술 확립으로 유용 의약품 생산 및 기반 확립 				
연구성과 활용시 애로사항 및 건의사항 (500자 이내)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술 사업화 지원 확대 필요 <ul style="list-style-type: none"> - 기술 개발 후 후속 지원이 미미한 관계로 우수 기술이 사장 됨 (초기 지원도 무용지불화 되는 경향이 많음) 					

연 구 성 과 의 활 용	기술거래				
	번호	기술실시계약명	기술실시대상기관	기술실시발생일자	당해년발생액
	1	Method and kit for semen diagnosis through color changes in methylene blue and semen quality evaluation using same	바이오컬처(주)	2015. 8.(예정)	10,000천원
	2	탄성 부재를 포함하는 액체 주입 장치	바이오컬처(주)	2015. 8.(예정)	10,000천원
	사업화				
	번호	사업화명	제품명	업체명	사업화 형태
	1	정액진단키트	스perm조아	바이오컬처(주)	자체 활용
	교육 및 지도활용 내역				
	번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
	정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
	번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	연구제목	연구자	활용년도	
1	농림기술개발사업	산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식수정란 생산 기술 확립	이장희	2014	

산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장, 규격 등), 신품중, 프로그램개발					
번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
1	Method and kit for semen diagnosis through color changes in methylene blue and semen quality evaluation using same	BIOCULTURE Inc.	13123202	국제 특허출원 (미국)	(2011. 4. 7)
2	Method for the assessment of a semen quality and kit for the same	바이오컬처(주)	201210083488 X	국제 특허출원 (중국)	(2012. 3. 27)
3	녹용세포의 증식 촉진 방법	중앙대 산협단 바이오컬처(주)	2012-0036109	특허출원 (대한민국)	(2012. 5. 25)
4	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기	공주대산협단, 바이오컬처(주)	10-2013-006974	특허출원 대한민국	(2013. 6.18)
5	탄성 부재를 포함하는 액체 주입 장치	바이오컬처(주)	1263914	특허출원 대한민국	(2013.05.07등록)
6	스웸조아	바이오컬처(주)	40-0911019	상표등록	2012. 03. 19
논문(국내외 전문 학술지) 게재					
번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지게재일	SCI구분
1	Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk	Reproductive Biotechnology, Supl.p. 33-34	이장희	2013. 5	비SCI
2	Enhancement of In Vitro Culture Efficiency of Mesenchymal Stem Cell Derived from Deer Antlers.	Tissue Eng. Regen. Med., 11(1): XX	김기중	2014.1(예정)	SCI
국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	발표자	발표제목	게재지명	권(호), 발표일자	
1	이장희	Phenol Red를 이용한 돼지 정액의 주입 전 간편 품질 평가 액상정액 개발	Reprod Dev Biol.,	34(2): 20-21.	
2	이장희	엘크 시슴에 있어서 발정 및 배란동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향	The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology, Assisted	Reproductive Biotechnology. p. 107.	
3	이장희	시슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향	The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology, Assisted	Reproductive Biotechnology. p. 96.	
4	Lee, Jang-Hee	Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk	The 11th International Symposium on Developmental Biotechnology	Supl.p : 33-34.	
5	이장희	Phenol Red의 색상변화를 이용한 주입 전 간편 품질 평가 돼지 액상정액의 개발.	한국수정란이식학회지	26 : 58	
6	김기중 등	Enrichment of Undifferentiated Spermatogonia and Germine Modification Using Lentiviral Vector in the Pre-Pubertal Bull Testis	44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction	2011.7.31-8.4, Oregon Convention Center Portland, Oregon	
7	김용희 등	Stage-specific embryonic antigen-1 is a specific surface marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal boar testis	44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction	2011.7.31-8.4, Oregon Convention Center Portland,	

국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명
8	이장희	엘크 사슴에 있어서 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향	한국수정란이식학회지	26(supl.) : 59.
9	이장희	사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발	Repr.od Dev Biol	35(2): 44.
10	김기중	녹용세포의 효율적인 체외배양시스템 개발에 관한 연구	한국수정란이식학회지	29(supl.): 32.
11	김기중	녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발	한국수정란이식학회지	29(supl.) : 33.
12	이장희	사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향	한국수정란이식학회지	29(supl.): 63.
13	이장희	사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향	The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology	Supl. p. 104.
14	이장희	꽃시슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향	한국수정란이식학회지	29(supl.) : 69.
15	이장희	꽃시슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향	한국수정란이식학회지	29(supl.) : 70.
홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	제목	일시

연구성과의 활용용

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)									
번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도				
1	박람회	충남농업기술박람회	스핀조아, 분만알리미	충남 예산 농업기술원	2010 (10.20~23)				
2	전시회	서울국제명대회	스핀조아, 분만알리미	서울코엑스	2010 (12.2~5)				
3	박람회	농업과학기술대전	스핀조아, Ring-CIDR	서울코엑스	2012 (9.17~19)				
4	박람회	국제바이오박람회	바이오센싱, 의료기구	일본 동경	2010. (6.29~7.02)				
5	박람회	국제전자산업 엑스포	바이오센싱, 의료기구	중국상하이	2011 (7.21~28)				
6	전시회	RHDUSN 국제전시회	스핀조아, 분만알리미	서울 코엑스	2011 (11. 17)				
기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)									
번호	일자	활용명칭				활용내역			
연구인력 활용/양성 성과									
번호	인력양성명	인력양성년도				인력양성 대상수			
국제화 협력성과									
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공	
기타 홍보실적(수상실적)									
번호	일자	홍보명칭				주요내용			
1	2010. 12.05.	The Daignosis Method of Semen Using Methylene Blue Solution And The Daignostic Kit For The Quality of Semen Using Thereof.				2010년 국제발명 진흥대회 금상 수상			
2	2010. 12.05.	Long Term Preservation Method of Original Form of Garden Balsam Through Vacuum Treatment After Rapid Freeze-Drying.				2010년 국제발명 진흥대회 은상 수상			
3	2011. 9. 17 (천안시장 제9067 호)	표창장				독서생활화로 다독자로 선정 됨			
4	2012. 5. 25	Best Poster Award 수상				2012년 한국수정란이식학회 춘계학술대회			
5	2012. 9. 20	장관 표창장 수상				제15회 농업과학기술대상			

연구성과의 활용

부록 4 - 연구 수행 후기

1. 전쟁 같은 동물 연구

2011. 10. 06. 이장희

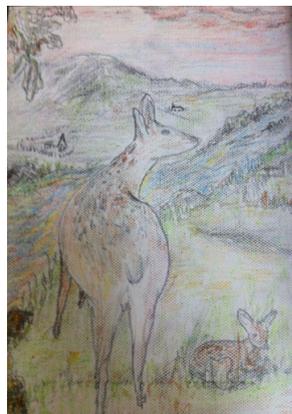
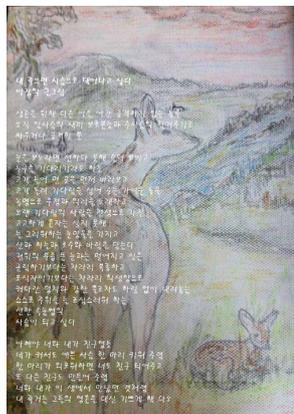
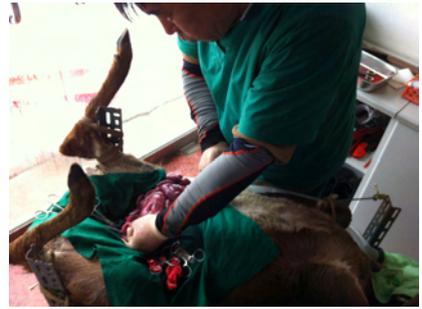
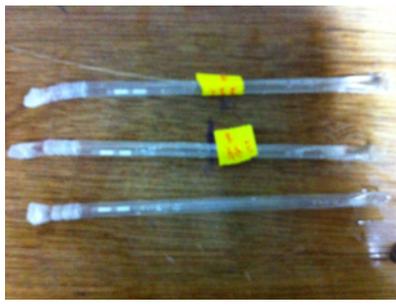
사슴과 같이 야생동물의 성질이 있는 가축(축화가 덜 된 경우)을 시험하는 것은 동물과 사람간의 전쟁을 방불케 한다. 연구팀의 시험처리를 위한 포획이나 주사 작업(마취 또는 약물 투여)을 개시하게 되면 시험축에게 선전포고와 같은 공격적 의미를 부여하게 된다. 잡으려고 하는 사람과 잡히지 않으려는 동물간의 전쟁은 공격을 당하는 동물의 입장에서는 죽기 살기의 심정으로 예측불허의 방향성과 속도로 대응하게 된다. 처음에 아무리 순조롭게 접근하여 한 두 번의 시험처치가 성공하였다 하더라도 그 이후의 시도는 곧 전쟁을 방불케 한다. 이러한 과정에서 사람은 다소 안전성이 보장받는 입장에 있지만 동물은 생사의 갈림길에 처해진 것처럼 행동하게 된다. 인간사의 모든 전쟁에서도 힘 있는 자가 힘없는 자를 무자비하게 공격하는 것과 다름이 없다. 그리하여 처치 과정(처리 전)에서도 사슴이 크게 다치거나 죽는 경우도 발생하게 되며, 사람 또한 사슴의 공격을 당해 심하게 다치기도 한다. 매년 사슴의 번식계절이 오면 인위적으로 동시에 수태시키기 위하여 발정을 발현시키기 위한 호르몬처리(발정유도제 투여), 인공수정 및 수정란이식 등의 시험이 수행되는데 대개 1~3개월이 소요된다. 매일같이 전쟁터에 임하는 군인과 같이 작업복(실험복)을 입고 사슴과 덩굴다 보면 하루하루의 생존에 안도감을 가지게 된다.

전쟁 같은 시험 처치가 끝나면 사슴도 지친 기력이 역역하며, 공포와 같은 시간 속에서 제대로 임신이나 될까 염려가 된다. 그리하여 다른 가축에 비해 수태율이 낮은 결과를 초래하게 되는 것이다. 시험에 참여한 젊은이들은 뜻하지 않는 사슴의 공격에 잘 회복되지만 노인들은 한번 사슴의 공격을 당하게 되면 치명적이 될 수 있다. 대개 사슴의 습성을 잘 알고 사슴을 대하게 되면 사슴의 행동도 예측이 되지만 사슴을 잘 모르는 경우에는 사슴 행동의 예측이 불가하여 뜻하지 않는 공격을 당하게 되는 것이다. 그리고 노인들은 행동이 둔하기 때문에 사슴공격을 피하기 어렵다. 사슴을 몰이하거나 이동시킬 때는 반드시 사슴의 눈을 주시해야 한다. 또한 선불리 물러서면 영락없이 공격을 허용하게 되어 매우 위험스럽다. 엘크라는 사슴은 소보다 약간 덩치가 작지만 키는 소보다 높다. 그리고 매우 빠르다. 그리하여 사슴을 대할 때는 반드시 무기를 지녀야 한다. 이때의 무기란 총이나 칼이 아니라 사슴 키보다 긴 막대나 방패를 말한다. 번식계절의 숫사슴은 자기영역 안의 침입자에 대해서는 순식간의 공격이 이루어지며 이때 주로 머리(뿔)을 이용한다. 한번만 공격하는 것이 아니라 머리로 상대를 짓이겨버리는 것이다. 매우 위험하지 않을 수 없다. 암사슴은 주로 앞발을 사용하여 공격한다. 새끼가 떨어진 암사슴은 혹시 상대가 새끼를 상하게 할까봐 새끼 근처에라도 기웃거리면 쏠살같이 달려와 앞발로 상대를 타격하는 것이다. 상대가 쓰러지면 앞발로 짓밟아버린다. 사슴 발굽 한방이면 갈비뼈가 부러지지 않을 수 없다. 머리에 가해지면 즉사하기 쉽다. 필자는 사슴 연구 중에 많은 사람이 공격당하는 것을 목격했다. 나는 전투에 임하는 소대장처럼 실험 처치자나 실험대상인 사슴 무리와 개체 하나하나들에게서 마음을 놓을 수가 없다. 10여 년 전에 전남 영광에 계신 축주 한분은 엘크 암사슴의 공격을 당하여 3개월간 입원 치료로 겨우 목숨을 건졌으며, 금년의 시험에서도 마취에서 느닷 없이 깨어 튀어 나가는 꽃사슴에게 들이 받쳐 축주 한분이 오래 동안 가슴통증을 견뎌야 했으며 몰이하던 한분도 죽을 위기에 처하기도 했다. 사색이 되어 공포에 젖은 그분의 눈을 앓을 수가 없다. 본인도 아무 생각 없이 수사슴장 안에 들어갔다가 순식간에 달려온 사슴에 순간 정신을 잃을 정도의 패닉 상태를 경험하기도 했다. 들어 받치지 않고 순식간에 문을 닫고 피했지만 한 순간 멍하니 서 있을 수밖에 없었다. 그리하여 사슴을 다루는 사람은 전쟁에 임하는 군인과 같은 자세여야 한다. 상대의 공격을 허용하는 경우에는 살아남을 수 없거나 치명상을 입기 쉽기 때문이다. 금년에는 사슴 처치 막바지에서 시험처치를 중단할 수밖에 없었다. 밤늦게 까지 시험처치로 지친 연구원과 사슴들로부터 더 이상 안전을 보장할 수 없었기 때문이었다. 전쟁 같은 사슴 실험이 끝나면 겨우 올해도 사고 없이 연구를 수행하였다는 안도감이 밀려오는 것이다. 사슴도 상처받지 않기를 기도하지만 함께 연구에 동참하는 많은 사람들도 무탈하기를 빌고 또 비는 것이다. 연구에 참여한 사람들이 무탈하도록 위험하고 힘든 일은 거의 본인이 도맡을 수밖에 없다. 그들이 다치기 보다는 내가 다치는 편이 오히려 더 안심이 되니까. 그들은 나를 도운 것만으로도 다쳐서는 아니 되기 때문이다. 번식계절 동안 시험처치에서 사슴 대역섯 마리가 죽어 나갔다. 우린 사냥 같은 전쟁도 익힐 수 밖에 없다. 가을과 봄에는 뿌연 먼지 일어나는 작은 사슴 농장 안에서 전쟁이 일어난다. 마취를 하려는 인간과 마취당하지 않으려는 사슴 사이에서. 야생동물을 다루는 다큐멘터리를 보면 마치 전쟁 같은 장면이 보일 것이다. 우리의 연구처럼.

우리들의 연구에 숨진 많은 사슴들의 영혼에 감사하며 그들의 죽음이 헛되지 않도록 최선을 다하여 연구에 임할 수밖에 없다. 그들의 넋을 위로하며 선한 눈망울을 가진 사슴을 사랑하지 않을 수가 없기에 그들을 연구한다. 그들에게 관심을 놓을 수가 없다. 내년에 또 절각시기 및 번식계절이 오기 전에 전쟁 준비를 미리 해 두어야 하겠지만 차년도 연구도 무탈하길 빈다. 우리 연구원들과 사슴의 영혼이 폐해지지 않고 기쁨으로 오래토록 살아남기를 기도해 본다.

<연구 수행의 자취 들>





2. 사슴의 영혼을 축원하며

2013. 08. 20 이장희

사슴의 눈망울은 선하다 못해 슬프다.
연구를 수행하느라 수없이 목숨을 잃은 사슴들의 영혼에 고개 숙여 그 아픔을, 그 슬픔을 위로해 드린다. 인간이 행하는 가장 못된 행위 중에 한 가지가 위정자의 논리로 일으키는 전쟁이라면, 어떤 명분이든 간에 인간의 유익을 구하기 위해 다른 동물(종족)의 생명을 함부로 빼앗은 행위 또한 위정자와 같은 논리로 전쟁을 일으키는 행위와 같을 것이다.

연구를 수행하면서 마치 연구책임자가 생사여탈권이라도 가진 것 마냥 슬하에 많은 사슴들을 죽게 만들고 또 스스로가 죽어가도록 연구 환경에 몰아세운 죄가 나는 너무도 크다. 나로 비롯해 죽어간 많은 사슴들의 영혼에 명복을 빌며 그들이 느꼈을 평화, 애증, 공포, 사랑도 인간과 같았겠지만 사람이 죽어 다시 환생한다면 나는 사슴으로 다시 태어나 죽어간 사슴과 같은 생(生)을 살며 그 죄를 다하고 싶다. 더 바람이 있다면 우리나라 금수강산에 오래도록 살아남는 십장생들과 함께 살고 싶다. 신라 문무왕이 죽어 해저에 묻히면서 다시 용(龍)으로 태어나 우리나라를 지키겠다는 포부처럼 아름다운 우리나라를 만들고 싶다.

내 죽으면 사슴으로 태어나고 싶다

이장희

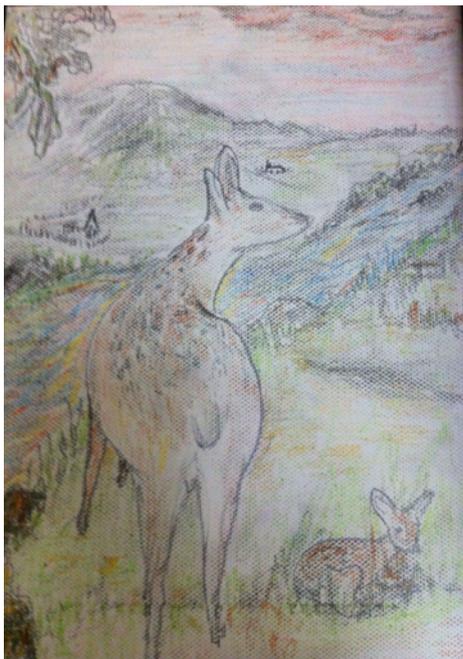
생존을 위해 다른 이를 여간 공격하지 않는 동물
오직 암사슴의 새끼 보호본능과 수사슴의 힘겨루기로
싸우거나 공격할 뿐

눈을 보노라면 선하다 못해 슬퍼 보이고
누구를 기다리기라도 하듯
고개 들어 먼 곳을 먼저 바라보고
고개 돌려 기다림을 심어 주는 가여운 동물

녹명으로 우정과 의리를 노래하고
오랜 기다림의 사랑을 천성으로 가진
고고하게 혼자 살지 못해
늘 그리워하는 눈망울을 가지고
산과 하늘과 호수와 바람을 담는다

권위의 부름 뜬 눈과는 멀어지고 싶은
군림하기보다는 차라리 복종하고
포식자이기보다는 차라리 희생양으로
커다란 덩치와 강한 뿔조차도 하릴 없이 내려놓는
스스로 주위를 늘 조심스러워 하는
선한 속눈썹의
사슴이 되고 싶다

아헤야 너와 내가 친구였듯
네가 커서도 예쁜 사슴 한 마리 키워 주렴
한 마리가 외로워하면 너도 친구 되어주고
또 다른 친구도 만들어 주렴
너와 내가 이 생에서 만났던 것처럼
내 죽거든 그들의 영혼을 대신 기쁘게 해 다오



3. 연구에 도움을 준 많은 동료 연구원들께 감사드리며

2013. 08. 이장희

전쟁 같은 동물 연구를 수행하면서 본 연구에 도움을 준 많은 연구자들에게 감사드립니다. 때론 새벽 연구에, 때론 야간 연구에, 때론 휴일 연구에, 때론 밤늦은 연구에 무상으로 몸도 사르지 않고 또 그 어려운 개인 사정을 기꺼이 미루고 연구 동참에 희생하여 준 나의 연구 동료들에게 머리 숙여 감사드립니다.

연구를 지휘하는 지휘자처럼, 또는 적진 속으로 돌격시키는 소대장처럼 시간을 기획하고, 통제하고, 지시하고 부탁하고, 당부했던 본인의 무지막지한 요구에 기꺼이 응당하여 준 동참 연구원들에게 연구결과를 함께 나누며 이제야 비로소 건배라도 제의하며 축제의 장으로 모시고 싶습니다. 더 성심성의를 다하지 못한 부끄러운 노력의 결실일지라도 나는 행운아처럼 많은 사람들의 격려와 도움을 함께 받으며 본 연구를 수행하였습니다. 때론 반목으로 절망의 늪에서 헤매기도 하였지만 운명처럼 내 부족으로 탓하며 다시 새벽을 열고 연구의 전장에 나서곤 하였는데, 지금까지 실로 사슴 연구에 10년 이상을 몸 받쳐 왔습니다.

본 연구를 마감하는 시점에서 사슴의 원산지 같은 저 시베리아 자작나무 숲에 살고 있는 우수리 원주민들의 제전과 같이 수없이 죽어간 암사슴들의 영혼을 위로하기 위해 자작나무에 향불로 먼저 명복을 빌고 싶습니다. 그리고 나의 지난날을 공감하며 함께 연구한 동료들이 비록 지금 뿔뿔이 흩어져 있지만 지금까지 험난한 연구에 동참해준 많은 사람들에게 진심으로 감사드립니다. 야생과 같은 사슴 연구에 기꺼이 위험까지 무릅쓰고 함께 일귀 낸 우리들의 기술들이 후학들에게 조금이라도 도움이 되길 바랍니다. 도움 받았던 것이상으로 되갚을 기회가 있다면 기꺼이 응하겠습니다. 고맙습니다. 오랜 기간 동안 연구를 격려해준 아내와 회사에서 함께 연구하는 이주형연구원에게는 특별히 더 고마움을 전합니다.

이 연구보고서를 함께 동참했던 사람들과 나누어 갖고자 합니다.

<기꺼이 동참해준 연구원들 및 사슴농장 사장님들>

1. 운봉산 사슴농장 김범호 회장님 (함께 사슴을 연구하며 지기知己가 되었음에 감사드립니다.)
2. 단국대학교 심호섭 교수님 (사슴 복제수정란 생산연구 협력에 감사드립니다.)
- 심호섭교수님 연구실에 재학 중인 석.박사 연구원들께도 감사드립니다.
3. 국립축산과학원 허태영 박사님(사슴의 외과적 채란, 이식 등의 기술개발에 협력하여 주셨습니다.)
- 함께 동참해준 정영훈 박사님의 많은 수의사님들께도 감사드립니다.
4. 소 번식아카데미 박성재 박사(원장)님(사슴 인공수정/수정란이식에 동참하여주셨습니다.)
5. 충북대학교 김남형 교수님(사슴 복제수정란 생산 효율 증진 기술 개발협력에 감사드립니다.)
- 김남형 교수님 연구실에 재학 중인 석.박사 연구원들께도 감사드립니다.
* 특히 허영남 박사님의 절대적 도움에 감사드립니다.
6. 사슴 연구에 기꺼이 동참해 주신 천안 인근 사슴농장 사장님들께 감사드립니다.
(한록원 사슴농장, 송암 사슴농장, 거록원 사슴농장, 비룡 사슴농장, 등등)
7. 협동연구기관인 중앙대학교 류범용 교수님과 그의 제자들(참여 연구원)
8. 협동연구기관인 공주대학교 이종완 교수님과 나의 제자들(신민석 등)
9. 행정지원과 지도에 힘써 주신 농림수산식품기술기획평가원 관계자분들께도 감사드립니다.
모두 고맙습니다. 감사의 절을 올립니다. 이장희.

* 시베리아의 깊고 광활한 자작나무 숲속에 살고 있는 우수리 원주민들은 사람의 영혼이 나무에서 태어나며, 이승에서 삶을 마치면 그 영혼이 남자는 물가의 버드나무로, 여자는 숲속 자작나무로 돌아간다고 믿는다.("시베리아의 위대한 영혼" 중에서, 박수용저. 김영사. 2012.)