

한국재래닭(오골계)종 배반엽세포에 있어서 동결 방법의 개선이 융해 후 생존율에 미치는 영향

김현 · 김동훈 · 박수봉 · 최성복 · 고응규 · 김재환 · 도윤정 · 박해금 · 김성우[†]

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

The Effect of Modified Cryopreservation Method on Viability of Frozen-thawed Blastodermal Cells on the Korean Native Chicken(Ogolgye Breed)

Hyun Kim, Dong Hun Kim, Soo Bong Park, Seong Bok Choi, Yeoung-Gyu Ko, Jae-Hwan Kim, Yoon Jung Do, Hae Geum Park and Sung Woo Kim[†]

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

For reconstituting genetic resource(Korean Native Chicken: KNC) with grem-line chimeric chicken made with cryopreserved blastodermal cells, the experiments were carried out to optimize cryopreserving conditions. Stage X blastodermal cells were collected from KNC embryos and dissociated. Cells were suspended in medium containing cyoprotectant and fetal bovine serum(FBS), and distributed into plastic ampules. Cell suspensions were seeded to induce ice formation at -7 °C to -35 °C in the experiments, the effect of modification of dissociation way, concentration of FBS and cell density on the viability of frozen-thawed cells were investigated by trypan blue exclusion. Then change the way of cell dissociation from pipetting to short time vortexing, viability of frozen-thawed cell tended to be increased from 29 % to 52 %. Increase concentration of FBS in frozen medium from 20 % to 80 % made viability of thawed cell from 28 % to 35 %. The viability of thawed cells were 33.9% frozen at 2 embryos/ 0.5ml, and 43.6 % frozen at 20 embryos/0.5 ml. Furthermore, combination of three modifications make big improvement. The viability of frozen-thawed cell was 60 % for combined method, and 41 % for general method. This result means the advance to practical cryopreservation of blastodermal cell of the KNC(Ogolgye breed).

(Key words : Blastodermal cells, Cryopreservation method, Viability, Korean native chicken(Ogolgye breed))

서 론

현재, 고 병원성 조류 인플루엔자 등의 심각한 전염병에 대비하여, 한국재래종을 시작으로 해서 희귀한 지역 특산 닭 등과 같은 뛰어난 능력을 가진 실용계의 확실한 장기 보존방법의 확보가 시급한 실정이다. 일반적으로, 닭의 장기보존방법에는 생체의 사육 그리고 계대에 의해 행해지고 있다. 그러나, 생체 사육은 전염병 발생의 위험성으로부터 완전히 보호하기 위해서는 여러 군데에 개체를 나누어서 사육해야만 하는데, 이에 막대한 경비뿐만 아니라, 토지가 많이 필요하게 된다. Naito 등은 이러한 문제점 때문에, 생식세포 등의 세포 수준의 방법을 이용하는 것이 바람직하다고 보고하고 있다(Naito 등, 2003). 조류

특히, 닭 생식세포의 장기보존은 정액과 초기 배자의 세포에 관한 연구가 보고되고 있다(Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Nakamura 등, 2009; Park 등, 2003; Petite 등, 2006).

보존하고 있는 한국 재래종 닭(여정수 등, 1993)의 복원을 하기 위해서 동결정액을 이용한 윤환교배를 반복하고 있지만, 이는 한쪽 성만을 보존하기 때문에 W염색체 포상의 유전정보가 손실될 우려가 있고, 완전한 원래의 고유 한국 재래닭으로 복원하는 것은 어려운 것이 사실이다. 하지만, 많은 연구자들의 노력의 결과, 초기배자의 동결보존에는, 다분화능력을 가진 배반엽세포를 이용하는 방법과 원시생식세포(Primordial germ cells: 이하 PGC)를 이용하는 방법들이 있다. 이 두 방법 모두 다 보존세포를 완전한 개체로 복원하기 위해서는, 보존세포를 다른

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ008240032012)에서 연구비를 지원 받았습니다.

[†] Corresponding author : Phone: +82-63-620-3562, E-mail: kim7268@korea.kr

수여자 배자에 이식을 하고, 일단, 생식계열 키메라(Germ-line chimeric chickens) 개체를 만들고, 생식계열 키메라 간의 교배 또는 암컷 키메라에 동결정액을 이용한 인공수정에 의해서 이루어지고 있다(Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Park 등, 2003; Petite 등, 2006). 양쪽의 성을 이용하기 때문에, 이론상으론 보존한 한국재래 닭의 완전복원이 가능하다. PGC를 이용한 방법에는 먼저 PGC의 채집은 stage 13~16(Hamburger 등, 1951)의 초기배자의 대동맥의 혈액으로부터 분리하고, 개체복원을 위한 키메라 제작은 보존세포를 발생 단계가 같은 수여자의 혈액 중에 이식을 한다고 보고하고 있다(Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Park 등, 2003; Petite 등, 2006). 이와 같이, 생식계열 키메라의 제작효율은 배반엽세포를 이용한 경우보다 높으나, PGC 채집과 수여자에 이식의 조작에는 능숙한 기술이 필요하다. 한편, 배반엽세포를 이용한 방법에서는 보존용 세포의 채집은 발생 스테이지 X(Eyal-Giladi 등, 1976)의 배반포로부터 세포를 분리하면 좋고, 개체복원을 위한 키메라 제작은 보존세포를 같은 시기의 배반하강 내에 주입·이식하는 것으로부터 가능하다고 보고되고 있다(Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Petite 등, 2006). 배반엽세포를 이용한 방법은 PGC에 의한 방법과 비교해 보면, 키메라 제작시에 고도의 기술이 필요하지 않고, 공급자와 수여자의 우모색 차이에 의해서 키메라의 조기 판별이 가능(Petite 등, 2006)하기 때문에, 실용기술로 하기에 적합하다.

동결 배반엽세포의 생식계열 키메라를 이용한 생체외의 복원을 실용화하기 위해서는, 배반엽세포의 동결보존 기술의 향상에 의해 동결·융해 후의 많은 생존세포를 확보하는 것과, 생식계열 키메라의 제작효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 그러나, 한국 재래닭의 배반엽세포를 기존의 방법에 의해 동결·융해한 경우의 세포생존율은 낮고, 동결 방법의 개선의 여지가 남아 있다. 이러한 문제점들을 해결해 나가기 위해서 많은 연구와 노력이 필요한데, 우선, 본 연구에서는 동결보존 기술의 개선에 의한 한국 재래닭 배반엽세포의 동결·융해 후의 생존율 향상을 위해서, 우선, 기존의 동결 방법의 개선을 목적으로 비교 및 검토를 하였다. 세포의 동결·융해의 과정에는 배반엽세포의 채집, 세포의 분리, 동결용액의 유리, 동결·보존 그리고 융해의 단계가 있고, 각각 여러 가지의 요인이 있으나, 본 연구팀은 우선, 동결 전 처리 과정 중에 3가지 항목에 대해서 연구 조사하였다. 즉, 동결 전의 세포의 단리 방법, 동결용액 중의 소 태아 혈청(이하 FBS)의 농도, 그리고 동결시의 세포밀도가 동결융해 후의 세포 생존율에 미치는 영향에 대해서 검토했다.

재료 및 방법

공시재료 및 시험계의 사양관리

본 실험에 사용된 공시계(김현 등, 2011)는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국재래닭 3원 교잡종인데, 가축유전자원시험장에서 보유하고 있는 56주령된 재래닭 오골계(Ogolgye)의 수탉 정액을 채취하여, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생

산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13°C, 습도 70~85%의 종란보관실에서 보관한 다음 실험실로 가져와 실험에 이용하였으며, 사양 관리는 한국가금사양표준(2008)의 NRC 사양표준에 준한 시판 종계사료를 급여하였다.

관행법에 의한 배반포의 동결

배반포세포의 채취와 단리

방란 직후의 오골계의 수정란으로부터 배반엽기의 배반을 도나츠상의 여과지를 이용해서 채집하고, 0.1% D(+)-글루코스를 함유한 인산완충액(이하 PBS-G)에, 중앙부근의 배반엽명부를 직경 약 3 mm로 세절하고, 2개의 배반을 1 ml의 2%의 병아리 혈청(이하 ChS)를 포함하는 PBS-G에 침지시켜 둔다. 2%ChS+PBS-G를 제거한 후, 2% ChS를 포함하는 갈슘·마그네슘 무첨가의 (이하 PBS(-)) 1 ml를 첨가해서 4°C에서 10분간 정치시킨다. 2%ChS+PBS(-)를 제거하고, 0.25% 트립신과 0.04% EDTA를 포함하는 2% ChS+PBS(-)를 1 ml를 첨가해서 4°C에 10분간 정치한 후, 동량의 10% 소태아 혈청(이하 FBS)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(이하 DMEM)를 첨가해 트립신 처리반응을 정지시켰다. 1,000 µl의 마이크로 피펫으로 피펫팅을 해서 세포를 단리·부유시켜, 240 G로 4분간 원심분리를 했다. 윗부분의 맑은 액을 제거한 후, 세포 부유용액으로 10%FBS+DMEM을 270 µl 첨가해서 같은 방법으로 세포를 재부유시켰다. 이러한 동안에 20 µl를 트리판 블루 염색을 하고, 혈구 계산판을 이용해 세포의 생존율을 확인하고, 남은 250 µl를 동결에 이용했다.

세포의 동결용액의 부유

플라스틱제 동결용 튜브 (COENING제 25723-1)에 세포 부유액을 250 µl를 넣고, 같은 양의 항동해제(20% DMSO (이하 DMSO)+30% FBS+50% DMEM)를 첨가해서 최종 농도를 DMSO 10%, FBS 20%로 조정했다.

세포의 동결 및 보존

세포를 넣은 동결용 튜브를 프로그램 freezer(NIHON FREEZER제 MH-70F2)의 에탄올 통에 침지해서 동결했다. -7°C에 8분간 유지하고, 튜브 온도를 에탄올통과 같게 하고 나서 바로 열게 하고 10분간 더 유지한 뒤, 분당 -1°C의 하강속도로 -35°C까지 냉각시키고, 그 다음에 액체질소(-196°C)에 침지하고 융해 때까지 보관한다.

동결세포의 융해와 융해 후의 생존율 측정

액체질소 탱크로부터 동결용 튜브를 끄집어 내어, 곧바로 37°C 온탕에 3분간 담그고, 융해를 했다. 세포를 부유시킨 플라스틱제 15 ml 원심관으로 옮겨서, DMSO의 희석 제거를 위해서, 10% FBS+DMEM를 30초 간격으로 100 µl, 100 µl, 100 µl, 200 µl, 1,000 µl 그리고 8 ml를 넣고 240G에서 6분간 원심분리를 한 뒤, 상층액을 제거했다. 세포는 125 µl의 10% FBS+DMEM에 부유시켜, CO₂ 배양기(5% CO₂, 38°C)에서 3시간 배양한 후에, 20 µl를 빼내어 트리판 블루 염색을 하고 생존율을 측정·검사했다.

실험군 설계

실험군은 총 4개의 군으로 디자인을 했다. 먼저, 실험군 1에서 3까지는 관행법에 의한 방법 중에서 배반엽세포의 채집, 단리 그리고 동결용액에의 부유에 대해서 새롭게 수정을 했다. 게다가, 실험 4에서는 실험 1부터 3에서 얻은 결과를 모두 조합한 새로운 개선구를 설정해서 기존의 방법으로 실험한 즉, 관행구와 그 결과 등을 비교 검토했다.

실험 1: 세포단리 방법의 영향

배반엽세포의 채집과 단리 방법 중에, 트립신 반응 처리 후의 처리방법에 의한 실험군을 설정했다. 상기의 관행법에 의한 세포를 단리하는 것을 피펫팅구로 하고, flushing구에는 시험관 mixer(Scientific Industries제 G-560)로 수회의 단시간 세정에 의한(이하 flushing) 세포를 단리·부유시켰다.

실험 2: 동결용액 중의 FBS 농도의 영향

세포의 동결용액의 부유 중에, 세포를 동결할 때의 동결용액의 최종 FBS 농도를 변경하고, 20, 40, 60 그리고 80%로 되게 조정된 실험구를 설정해, 서로 비교 분석했다. 20%구는 관행법의 세포 부유용액과 항동제(20%FBS+10%DMSO+DMEM)를 이용했다. 40%구는 세포 부유액을 20% FBS+80% DMEM, 항동제를 20% DMSO+80% FBS로 하고, 최종 FBS 농도를 40%에 맞게 조절했다. 60%구는 세포 부유액을 20% FBS+80% DMEM, 항동제를 20% DMSO+80% FBS로 하고, 최종 FBS 농도를 60%에 맞게 조절했다. 마지막으로, 80%구는 세포 부유용액을 80% FBS+20% DMEM, 항동제를 20% DMSO+80% FBS, 최종 FBS 농도를 80%로 조절했다.

실험 3: 동결시 세포밀도의 영향

동결시의 세포밀도를 관행법의 2.5배, 5배 그리고 10배 높은 실험구를 설정하고, 융해 후의 세포생존율을 관행법과 서로 비교 검토했다. 관행법(2개 배자/500 μ l)에 의해서, 한 개의 동결용기에 2개 배자 분의 세포를 500 μ l의 동결용액량에 부유시켜(추정 세포 수 1.5×10^5 개/ml)를 동결했다. 5개/500 μ l(추정 세포 수 3.0×10^5 개/ml), 10개/500 μ l(추정 세포 수 8.0×10^5 개/ml) 그리고 20개/500 μ l(추정 세포 수 16.0×10^5 개/ml)에는 동결용기당의 동결용액량은 변화없이 배자수를 5개 배자, 10개 배자 그리고 20개 배자로 증가시켜, 세포밀도를 높여 동결을 실시했다.

실험 4: 개선된 동결 방법과 관행법과의 상호비교

실험 1부터 3에서 얻은 결과를 기본으로 해서 개선한 동결 방법을 이용한 동결처리구와 기존의 동결 방법을 이용한 관행구와 동결·융해 후의 세포생존율을 서로 비교했다. 개선처리구에서는 세포의 단리·부유를 flushing 방법을 이용했고, 세포 부유용액에 80% FBS+20% DMEM를, 항동해제에 20% DMSO+80% FBS를 이용해 최종 FBS 농도를 80%로 해, 한 개의 동결용기당 20개 배자분의 세포를 500 μ l의 용액 중에 동결했다.

통계 분석

본 시험의 성적은 SAS package program(2000)를 이용하여 분산 분석을 실시하였으며, 처리 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다.

결 과

실험 1: 세포분리 방법의 영향

배반포세포의 단리를 피펫팅 혹은 flushing를 했을 때의 동결융해 후의 세포생존율을 Fig. 1에 나타냈다. 먼저, 관행법의 피펫팅에서는 29.2%의 생존율을 나타내었다. 하지만, 새롭게 시도한 flushing 방법의 처리군에서는 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 50.8%로 생존율이 증가하는 경향을 확인했다.

실험 2: 동결용액중의 FBS 농도의 영향

동결시 용액 중의 FBS 농도를 증가시켰을 때의 융해 후의 세포 생존율을 Fig. 2에 나타냈다. 관행법의 FBS 농도 20%에서는 생존율이 27.8%였는데 반해서, FBS 40% 그리

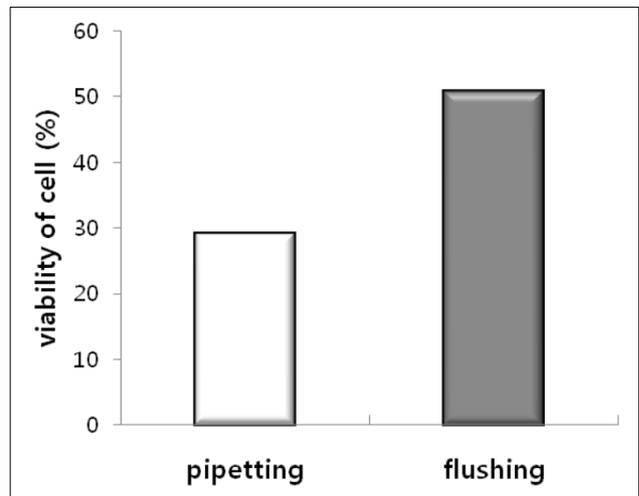


Fig. 1. Effect of modification of dissociation way on viability of frozen-thawed biastdermal cells.

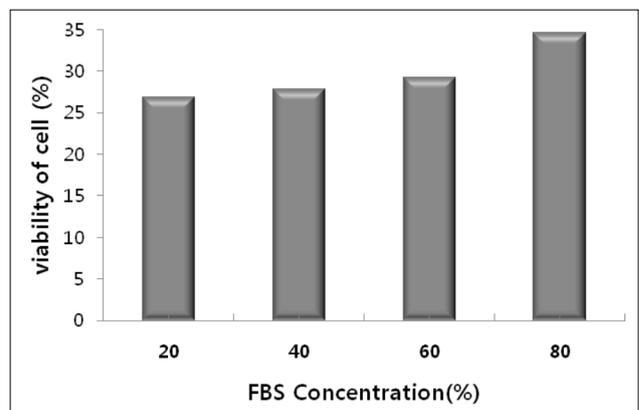


Fig. 2. Effect of different concentrations of FBS on viability of frozen-thawed biastdermal cells.

Table 1. Effect of different concentration of cell density on cell viability of frozen-thawed blastodermal cells

Treatment	Cell density ($10^5/ml$)	Recovery rate(%)
2 embryos/500 μl ¹⁾	1.62±0.67	33.9±11.4
5 embryos/500 μl	3.12±0.98	34.1±9.8
10 embryos/500 μl	7.20±1.10	38.7±6.2
20 embryos/500 μl	21.0±2.24	43.6±8.4

¹⁾ control group.

This experiment was replication three times. Data are the mean±SD.

고 60%군에서는 각각 28.9, 29.1%의 증가율을 나타내었다. 특히, FBS 80% 농도에서는 34.5%였다. 동결시의 FBS 농도 증가에 의해서, 유의적인 차이는 없었지만, 용해 후의 생존율이 향상하는 경향을 보였다.

실험 3: 동결시의 세포밀도의 영향

한 개의 용기(액량 500 μl)에 넣은 배자 숫자를 변화시켰을 경우, 동결시의 세포밀도가 용해 후의 생존율에 미치는 영향을 Table 1에 나타냈다. 관행법의 2개 배자/500 μl 처리군에서는 생존율이 33.9%인데 반해서, 5개 배자/500 μl , 10개 배자/500 μl 그리고 20개 배자/500 μl 의 처리군에서 각각 34.1%, 38.7% 그리고 43.6%였다. 이러한 결과들로부터 세포밀도가 높아짐에 따라서 용해 후의 세포의 생존율이 유의적인 차이는 없었지만, 향상되는 경향을 확인할 수 있었다.

실험 4: 개선된 동결 방법과 관행법과의 비교

세포의 단리 방법의 변화, 동결시의 FBS의 고농도화 그리고 동결시의 세포밀도를 높여 주는 것에 의한 동결 용해 후의 세포생존율에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타냈다. 20개 분의 배반을 트립신 반응 처리 후 flushing 방법

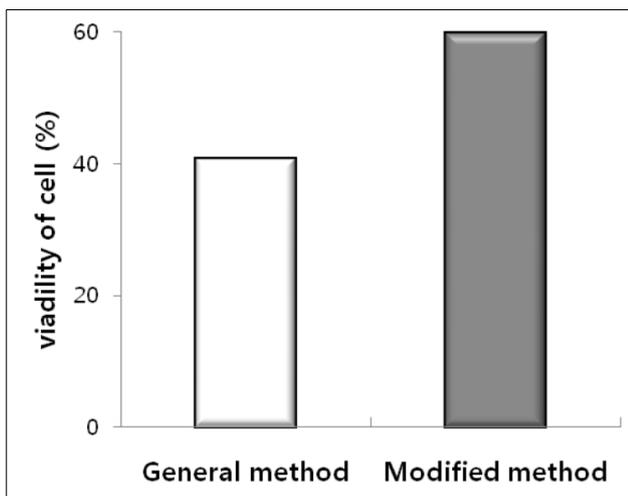


Fig. 3. Effect of combination of three modifications on viability of frozen-thawed blastodermal cells.

에 의해 세포를 단리하고, FBS의 최종 농도를 80%의 동결용액 500 μl 중에서 동결한 개선구의 생존율과 관행법으로 동결한 관행구와 비교 검토한 결과, 관행구 40.7%와 비교해서 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 새롭게 개선한 처리구에서 높게 59.7%로 향상되는 경향을 확인하였다.

고 찰

지금까지 닭의 키메라의 제작에는 흰색 레그혼과 날개 깃털색의 차이가 큰 얼룩진 플리머스-록(Plymouth Rock)종이 잘 이용되었는데(Kino 등, 1997; Petite 등, 1990), 아직까지 한국재래닭(이하: 오골계종)의 배반엽세포의 동결보존뿐만 아니라 이것을 이용한 키메라 제작에 관한 보고는 없다. 본 연구팀이 Kino 등의 방법(Kino 등, 1997)을 참고한 기존의 방법(이하: 관행법)에 오골계종의 배반엽세포를 동결했을 경우에, 용해 후 3시간의 생존율은 Fig. 1과 2에 나타낸 것과 같이 대략 30%에서 40% 정도이다. 생식계열 키메라를 이용해서 한국 재래닭 복원을 할 경우에는 용해 후의 생존율 향상과 키메라 제작 효율의 향상이 먼저, 절대적으로 필요하다고 생각된다. 그래서, 본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서, 먼저 오골계의 배반엽 세포의 동결 방법의 개선에 의한 용해 후의 생존율 향상에 초점을 맞추고, 비교 검토했다.

세포의 분리 방법에 대해서, 마이크로 피펫에 의한 피펫팅보다 Kino 등 (Kino 등, 1997)이 사용한 시험관 믹서에 의한 flushing의 방법이 동결 용해 후의 생존율이 높게 나타나는 경향이 있다(Fig. 1). 기존의 피펫팅법보다는 적당한 flushing을 이용한 방법이 배반엽 세포의 분리에 더 효과적이라고 생각되어진다. 세포를 동결할 용액에는 항동해제로써 10% DMSO과 세포 비 침투성의 세포 보호제로써 기능을 하는 소 태아 혈청(FBS)을 관행법에서는 최종 농도 20% 첨가했다. 그러나, 본 연구에서는 FBS의 최종 농도를 80%까지 증가시킨 결과, 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 동결용해 후의 생존율이 향상되는 경향을 보였다. 더욱이, FBS 중의 극소량 성분이 동결 전 그리고 용해 후의 세포들에게 있어선 영양첨가인자로서 기능할 수 있는 가능성이 생각되어진다. 이런 결과로부터, FBS의 농도 증가는 용해 후의 세포 생존율을 크게 향상시키는 데 유효할 가능성이 사료되어진다.

동결에 이용한 배자 수를 2개에서 20개로 증가시켜서, 계산상 10배의 세포밀도로 했을 경우에 생존율이 33.9%에서 43.6%로 향상되는 경향이 있다. Kino 등 (Kino 등, 1997)은 얼룩진 플리머스-록(Plymouth Rock)종 배반엽세포에 있어서, 동결시의 세포밀도를 1.6×10^5 개/ml부터 8.0×10^5 개/ml로 높여줌으로써, 동결용해 후의 생존율을 33%에서 42%로 향상시켰다. 오골계종의 세포에서도 동결시의 세포밀도를 높여주는 것이 동결용해 후의 생존율의 향상에 유효하다는 것을 본 연구를 통해서 확인할 수 있었다. 동결용해 후의 생존율이 낮았던(2개 배자/500 μl) 처리군에서는 잘 분리되는 세포들이 많았지만, 생존율이 높았던(20개 배자/500 μl) 처리군에서는 세포덩어리가 남아 있는 것이 많이 관찰되었다. 또한, 동결 시에는 부유시킨 세포가 용기의 밑바닥에 침전해 있었다. 이런 현상들

로부터 종합해서 생각해 보면, 많은 세포를 한 번에 일괄적으로 동결시키거나, 완전히 세포를 분리하지 않는 것으로 세포간의 보다 밀집된 상태로 유지시켜 주는 것이 결국, 최종적으로 어떤 좋은 영향을 미쳐서 그 결과 항 동해성을 높여 주었다고 사료되어진다. 오골계종 배반엽세포를 이용한 기존의 방법(관행법)으로 동결을 하면, Fig. 1과 2에 나타난 것과 같이 융해 후의 생존율이 대략 30~40%로 낮았다. 이에 반해서, 세포의 분리 방법, 동결시의 세포밀도 그리고 동결용액의 FBS 농도의 개선을 조합한 개선구에서는 융해 후 생존율이 60%의 큰 폭으로 향상하는 경향을 확인할 수 있었다. Kino 등(Kino 등, 1997)은 피펫팅으로 단리한 플리머스-록(Plymouth Rock)종의 배반엽세포의 동결 방법에 대해서, 동결시의 세포밀도의 개선에 의한 동결융해 후의 세포생존율을 33%부터 47%로 개선했다고 보고하고 있다. 이 결과와 비교해 보아도 본 연구 결과는 뛰어난 성과이고, Kino 등(Kino 등, 1997)의 개선에 더 해서 동결용액 중의 FBS 농도를 높게 한 개선구의 방법을 가지고 배반엽세포의 동결보존기술을 향상했다고 말할 수 있을 것이다.

실제로, 동결보존세포로부터 복원한 품종을 유지하고, 더 나아가 개량하기 위해서는 복원 재래닭의 확실한 혈연정보가 필요하다고 생각되어진다. 다시 말해서, 배반엽세포의 혈연정보를 확실하게 해서 동결보존을 하지 않으면 안 된다. 왜냐하면, 동일한 양친을 가진 복수의 배자를 동시에 동결하는 것은 안되기 때문에, 동일가계의 배자를 한 개의 용기에 모아서 보존을 행하는 것이 될 것이다. 본 연구 중에서 네 번째 실험을 통해서, 개선구의 동결 방법은 한국재래종의 보존을 하기 위해서는 동일가계의 조합으로 될 수 있으면 많은 암수의 교배를 통해서 배반엽세포를 많이 확보해야 되는 필요성이 사료되어진다. 그러나, 최소 닭 등과 많은 배자의 확보가 안 되는 경우에 대응하기 위해서는, 금후 더욱 더 소수의 배자의 세포를 동결해서 융해 후의 생존율을 확보하는 동결 방법의 개발을 하지 않으면 안 된다. 또한, Kino 등의 보고에 의하면, 동결 배반엽 유래의 생식계열 키메라의 제작 효율은 9.6%로 비동결 배반엽 유래의 56.3%와 비교해서 상당히 낮다(Kino 등, 1997). 닭의 배반엽세포에 의한 동결보존의 실용화를 위해서는 금후 비약적인 기술 개선에 의한 생식계열 키메라를 상당히 높은 효율로 제작하는 것이 반드시 필요하다고 사료된다.

적 요

귀중한 한국재래닭의 배반엽세포를 냉동보존하고, 키메라 닭을 통한 재래종의 복원을 도모하는 방법을 실용화하기 위해서, 한국재래종의 배반엽세포에 있어 최적의 동결 방법에 대해 검토했다. 배반엽세포의 동결은 세포를 단리한 후, 항동해제와 소태아혈청(FBS)를 함유하고 있는 동결용액 중에 부유하고 수시성 동결용기 중에 넣고, 7°C에서 동결시키고 나서 분당 -1°C에서 -35°C까지 냉각하고 액체질소 안에 침지시켜서 실험을 진행했다. 동결조작 중에서 ① 동결 전의 세포의 단리 방법, ② FBS 농도, ③ 동결 시 세포밀도가 동결융해 후의 세포생존율에 미치는 영향을 조사했다. ① 세포의 단리 방법을 피펫팅으로부터

시험관 픽서에 의한 단시간의 flushing으로 변경하면, 동결융해 후의 세포의 생존율이 29%부터 51%로 향상된다. ② 동결용액 속 FBS 농도를 20%에서 80%로 증가시키면 동결융해 후의 생존율이 28%에서 35%로 증가한다. 또한, ③ 융해 후, 생존율은 (2개의 배자/0.5 ml) 처리군에서의 동결은 34%인 반면에, (20개의 배자/0.5 ml)에서는 44%였다. 더욱이, 이 세 가지 개선점을 조합함으로써 동결융해 후의 생존율은 60%로, 개선 전의 41%에 비하여 크게 개선이 될 수 있고, 한국재래종의 배반엽세포의 동결보존의 실용화가 보다 더 향상될 수 있는 방법이 될 수 있음을 시사한다.

인용문헌

- Eyal-Giladi H, Kochav S (1976): From cleavage to primitive streak formation : a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick I. General Morphology. *Development Biology* 49:321-337.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951): A series of normal stages in the development of the chicken embryo. *Journal of Morphology* 8:49-92.
- Han JY, Park TS, Hong YH (2002): Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained *in vitro* for an extended period. *Theriogenology* 58:1531-1539.
- Kino K, Pain B, Leibo SP, Clark ME, Etches RJ (1997): Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry Sci* 76:753-760.
- Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ (2010): Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* 29:511-518.
- Naito M (2003): Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *Journal of Poultry Science* 40:1-12.
- Park TS, Hong YH, Kwon SC (2003): Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ (EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 65:389-395.
- Perry MM, Sang HM (1993): Transgenesis in chickens. *Transgenic Res* 2(3):125-133.
- Petitte JN (2006): Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells. *Poultry Sci* 85:237-242.
- Petitte JN, Clark ME, Liu AM, Gibbins V, Etches RJ (1990): Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108:185-189.
- Petitte JN, Karagenç L, Ginsburg M (1997): The origin of the avian germ line and transgenesis in birds. *Poult Sci* 76(8):1084-1092.
- Petitte JN, Liu G, Yang Z (2004): Avian pluripotent

- stem cells. *Mech Dev* 121(9):1159-1168.
13. Shaw DL, Carsience RS, Etches RJ, Verrinder Gibbins AM (1992): The fate of femal donor blastodermal cells in male chimeric chickens. *Biochem Cell Biol* 70(10-11):1218-1229.
 14. Watanabe M, Kinutani M, Naito M, Ochi O, Takashima Y (1992): Distribution analysis of transferred donor cells in avaian blastodermal chimeras. *Development* 114(2):331-338.
 15. 여정수, 정태완, 한재용, 최창본, 김재우, 정선부 (1993): 한국재래계의 유전자 지문에 관한 연구. *한국가금학회지* 23:19-26.
 16. 국립축산과학원. (2008): 한국 토종닭 사육 및 인증기준 설정 연구. 가금수급안정위원회.
 17. 김현, 양보석, 고응규, 김재환, 최성복, 김성우 (2011): 한국재래닭의 계통별 번식능력 비교. *한국동물번식학회지* 35:391-394.
(접수일자: 2012. 3. 19 / 채택일자: 2012. 3. 26)