

## 한국재래닭(오계)의 유리화 동결 시 생존율에 미치는 Ethylene Glycol(EG)과 Propylene Glycol(PG)의 영향

김 현<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 한재용<sup>2</sup> · 최성복<sup>1</sup> · 고응규<sup>1</sup> · 도윤정<sup>1</sup> · 성환후<sup>1</sup> · 김성우<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

<sup>2</sup>서울대학교 동물자원학과

### Effect of Ethylene Glycol(EG) and Propylene Glycol(PG) on the Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cells(PGCs) on Korean Native Chicken(Ogye) by Vitrification

Hyun Kim<sup>1</sup>, Dong Hun Kim<sup>1</sup>, Jae Yong Han<sup>2</sup>, Sung Bok Choi<sup>1</sup>, Yeoung Gyu Ko<sup>1</sup>, Yoon Jung Do<sup>1</sup>, Hwan-Hoo Seong<sup>1</sup>, Sung Woo Kim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>WCU Biomodulation Major, Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

**ABSTRACT** This study established a method for preserving chicken primordial germ cells (PGCs) that enables long-term storage in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for preservation of the species. The purpose of this study was to compare the effects of Ethylene Glycol (EG) and Propylene Glycol (PG) on viability of cryopreserved PGCs with vitrification in Korean Native Chicken (Ogye), and to find or to the optimal protocol for PGCs freezing. One of the important components of cryopreservation process is cryopreservation medium that plays a vital role in preventing cellular injury during freeze-thawing. Cryoprotective agents have been known to improve cell viability after freeze-thawing. PGCs obtained from the germinal gonade of 5.5~6 day (stage 28) chick embryos, using the MACS method were suspended in a freezing medium containing a freezing and protecting agents. Gonads were harvested from stage 28 chick embryos and pooled in groups of 10E embryos, contributing gonads to the cell suspension. The gonadal cells, including PGCs, were then frozen in 1 of the following cryoprotectant treatments: 2.5% EG, 5% EG, 10% EG, 2.5% PG, 5% PG, 10% PG, and 0% cryoprotectant as a control. Effects of exposure to vitrification solution and vitrification, with different concentrations of the cryoprotectant solution, were examined. After freezing and thawing, survival rates of the frozen-thawed PGCs from the 0, 2.5, 5, 10 and 15% EG plus FBS treatment were 44.24%, 64.51%, 85.63%, 80.51% and 73.52% ( $p<0.05$ ), respectively. The viability of PGCs after freeze-thawing was significantly higher for 10% EG plus FBS treatment than for 10% PG + FBS treatment ( $p<0.05$ )(85.63% vs 66.81%). Therefore, these systems may contribute in the improvement of cryopreservation for a scarce species in birds preservation. This study established a method for preserving chicken PGC that enables systematic storage and labeling of cryopreserved PGCs in liquid N at a germplasm repository and ease of entry into a database. In the future, the importance for this new technology is that poultry lines can be conserved while work is being conducted on improving the production of germline chimeras.

(Key words : primordial germ cells (PGCs), vitrification, ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), viability, Korean Native Chicken (Ogye))

## 서 론

배아 및 세포의 동결 보존은 삼투압, 세포 내외의 얼음결정 형성 및 동결보호제의 독성 등에 의해서 다양한 세포의

손상을 일으킬 수가 있다. 저 농도의 동결 보호제를 사용하는 완전 동결법은 삼투압과 동결 보호제의 독성에 의한 영향이 적지만, 세포 내의 얼음결정 형성에 의한 손상이 심각하고(Bryant, 1995), 많은 시간을 요하고, 고가의 동결기기를

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : kim7268@korea.kr

필요로 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 완만 동결법의 단점을 보완하기 위해서 개발된 방법이 유리화 동결법이다 (Rall and Fahy, 1985). 유리화 동결법은 자동 전산화된 고가의 세포 동결기를 이용하지 않고 초 급속 동결을 위해 배아 혹은 세포를 동결보호용액에 직접 넣은 후,  $-196^{\circ}\text{C}$ 의 액체 질소(liquid nitrogen,  $\text{LN}_2$ )에 곧 바로 침지시키므로 매우 간단하고 특히, 비용이 적게 들며, 세포 내외의 얼음결정 형성을 극적으로 방지할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 고농도의 동결보호제를 사용해야 하므로 동결보호제의 독성을 고려해야 한다. 따라서 동결 및 융해 후의 높은 생존율을 위해서는 독성이 보다 적은 동결 보호제의 선택이 중요하다. 최근 유리화 동결을 위해 가장 많이 사용되고 있는 동결 보호제인 ethylene glycol(EG)은 낮은 분자량과 높은 침투능력(Gilmore et al., 1995) 그리고 비교적 독성이 적은 특징이 있다(Emiliani et al., 2000). 이런 장점으로 인간(Mukaida et al., 1998)을 비롯한 생쥐(Shaw et al., 1995), 백서(Jiang et al., 1999), 토끼(Kasai et al., 1992), 양(Cocero et al., 1996) 및 소(Donnay et al., 1998) 등 포유류 배아 및 생식세포 동결 보존을 위한 유리화 동결의 동결 보호제로서 많이 이용된다. 초기에는 침투성 동결 보호제인 propylene glycol(PG), dimethyl sulfoxide(DMSO), acetamide와 비 침투성 동결 보호제인 polyethylene glycol을 함께 사용하였지만, 이 용액은  $4^{\circ}\text{C}$ 의 저온에서 작업을 해야 하는 불편함과 동결 보호제의 독성이 심해, 그 후 널리 이용되지 않았다(Rall and Fahy, 1985). 그 후 Scheffen 등은 침투성 동결 보호제인 glycerol과 propylene glycol을 포함한 복합용액을 이용(Scheffen et al., 1986)하여 소의 상실배를 유리화 동결한 후, 출산에 성공하였다. 또한 Rall은 polyethylene glycol, glycerol, PG을 써서 생쥐 상실배의 유리화 동결에 성공하였으며(Rall et al., 1987), Kasai 등은 EG, ficoll, sucrose를 조합하여 생쥐 상실배의 유리화 동결에 성공하였다(Kasai et al., 1990). 최근 EG에 거대분자인 ficoll, 그리고 EG의 농도를 감소시키기 위해 sucrose가 혼합된 동결보호제가 주로 사용되고 있다(Mukaida et al., 1998).

고 병원성 조류인플루엔자(HPAI) 등의 심각한 인수 공통 전염병에 대비하여, 한국 재래품종을 시작으로 해서 희귀한 지역 특산 닭 그리고 상업적으로 매우 가치 있고, 중요한 실용계를 생산하는 종계의 유전자원을 완전한 형태로의 장기 보존 방법에 관한 연구가 아직 미흡하고, 시급한 실정이다. 일반적으로, 이러한 위협에 대하여 닭 유전자원의 보존은 살아 있는 최소한도의 집단을 살아 있는 그대로 다른 장소에 중복 보존하고, 사육하여 계대하는 방법에 주로 의존하

고 있다. 그러나 생체의 중복 보존은 악성 질병 발생에 대한 위험성으로부터 완전히 자유롭기 위해서는 여러 장소에 개체를 각각 나누어서 사육해야만 하고, 격리시설 및 방역시설 등과 더불어 위생유지 비용에 대한 막대한 경비가 필요할 뿐만 아니라, 많은 인력과 토지가 요구된다. 이런 관점에서부터 Naito 등은 이러한 문제점 때문에, 닭 유전자원은 생식세포 등과 같은 세포 수준의 방법을 이용하는 것이 바람직하다고 보고하고 있다(Naito, 2003). 조류 정액의 동결 보존은 닭(Polge, 1951)을 필두로 해 칠면조(Bakst and Sexton, 1979), 오리(Maeda et al., 1984) 그리고 두루미(Gee et al., 1985)에서 시도되었지만, 난자의 생리학적, 해부조직학적인 특징들 때문에, 난자와 초기배자의 효율적인 동결보존 방법은 지금까지 힘든 실정이다. 이러한 가금 유전자원의 보존 방법에 관한 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구자들의 노력에 의하여 초기배 자유래 세포의 동결방법이 하나의 대안으로 제시되었다. 유전자원으로 세포동결 보존에는 다분화 능력을 가진 배반엽 세포를 이용하는 방법(Watanabe et al., 1992)과 조류뿐만이 아니라 포유류 등에도 존재하여 성세포로 분화 가능한 능력을 보유하고 있어, 정소에서는 정원세포 혹은 난소에서는 난원세포로 분화하는 능력을 가진 세포 즉, 원시생식세포(primordial germ cells)를 이용하는 방법들이 있다. 이러한 방법들은 생식계열의 키메라(germline chimera) 개체를 생산한 후에 생식계열 키메라 간의 교배 또는 암컷 키메라에 동결정액을 인공 수정하는 방법으로 완전하게 유전자원을 복원할 수 있다(Han et al., 2002; Kino et al., 1997; Naito, 2003; Petite, 2006). 하지만 실험과정에서 닭 원시생식세포의 회수, 정제 및 조작에 있어 여러 가지 어려움이 있으며, 한 개의 배아에서 약 30개 정도의 극히, 제한된 숫자만 얻을 수 있다는 점은 더욱 연구를 어렵게 만들고 있다(Yasuda et al., 1992). 이와 같이 생식계열 키메라를 이용한 조류 유전자원의 복원을 위해서는 먼저, 가장 기초적인 닭 원시생식세포의 동결보존 기술의 향상이 필수적이다. 그러나 닭 원시생식세포의 동결방법 및 최적의 동결 보호제에 관한 직접적인 비교 및 검토는 아직 미흡한 실정이고, 더 나아가 닭 원시생식세포의 유리화 동결을 위한 최적 조건을 확립하고자 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 시험계의 사양관리

본 실험에 사용된 공시계(김현 등, 2011)는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국 재래닭 3원

교잡종과 가축유전자원 시험장에서 보유하고 있는 44주령의 한국 재래닭 오계(Ogye) 수탉에서 정액을 각각 채취하여, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13°C, 습도 70~85%의 종란 보관용 배양기에서 집란하여 부화기에 입란하고, 5.5일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 한국가금사양표준(2008)의 NRC 사양표준에 준한 시판 종계사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 그리고 남원시 소재의 일방양계 농가의 44~45주령의 한국육종협회3호(상업용 닭)의 수정란을 공급받아 시험에 공시했다.

## 2. 원시생식세포의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 사육 중인 실험 축을 사용하여 Hamburger-Hamilton(1951)의 배 발달 단계에 기초하여, 37.8°C, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 발생 초기배자로부터 원시생식선의 분리방법은 5.5일(stage 28 (Hamburger and Hamilton, 1951)) 동안 발생한 초기배자를  $Mg^{2+}$ 와  $Ca^{2+}$ 가 함유되지 않은 PBS(PBS (-), Sigma, St. Louis, MO, USA)가 담긴 큰 배양 접시에 옮긴 후, 실체 현미경(SZH : Tokyo, Japan) 하에서 예리한 핀셋을 이용하여 원시생식선 부분만을 분리한 후, MACS법에 의해 순수 정제를 하기 위해 이를 1.5 mL 튜브에 수집하여 실온에 두었다.

## 3. MACS 법에 의한 분리 및 정제

Park 등의 실험 방법을 조금 응용하여, 원시생식선은 0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 함유된 0.05% (v : v) 트립신 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣어 두었다(Park et al., 2003). 그리고 튜브는 37.8°C에 2분 간 배양 처리를 했다. 트립신 처리 후, 트립신-EDTA의 불활성을 위해서 10% 소태아 혈청(FBS : Sigma, St. Louis, MO, USA)을 처리하였다. 큰 세포 다발 그리고 분해되지 않은 조직의 단편들을 제거하기 위해서 세포 부유액은 20  $\mu$ m 격자 크기의 망 구조 필터(BD falcon, Cell Strainer, USA)를 이용하여 필터를 하고, 200 g에 5분간 원심분리를 했다. MiniMACS(magnetic-activated cell sorting) system(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용하여 원시생식선 유래의 닭 원시생식세포(gPGCs)를 순수 분리 및 정제하였다(Kim et al., 2004). 원심분리 후, 생식선세포(한 개의 튜브 당  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ )는 SSEA-1 항체를 이용하여 MACS 방법으로 순수 gPGCs를 정제하였다. 닭 생식선 유래 세포 혼합물을 원시생식세포 특이항체로 알려진

anti-stage specific embryo antigen(anti-SSEA)-1 항체(Santa Cruz Biotechnology, mouse IgM isotype : SSEA-1, MC-480)를 5% NGS/PBS에 1 : 200으로 희석하여 실온 20~25°C에서 20분 간 반응을 시켰다. PBS에 0.5% BSA와 2 mM EDTA가 함유된 1 mL MACS buffer로 세정을 하고 200 g에 5분간 원심분리를 수행한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 아래에 침전된 세포괴를 rat anti-mouse IgM microbeads 20  $\mu$ L가 포함된 100  $\mu$ L MACS buffer와 천천히 혼합하여 4°C에 15분 간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500  $\mu$ L buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정을 한 후 MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다(Kim et al., 2004).

## 4. 실험군 설계

동결보호제로서 EG와 PG를 사용하였고, 원시생식세포에 대해서 0(대조군), 2.5, 5, 10 그리고 15%의 농도로 조정된 동결용 배지와 동결배지의 기초가 되는 혈청으로서 15% 소태아 혈청을 기초로 하였다. 그리고 각 군의 원시생식 세포 수는 약 200개 정도로 조절하고, 동결방법은 유리화법을 이용해 동결 및 용해 후의 원시생식세포 생존율 측정은 0.4% 트리판블루 염색액을 이용해(Freshney, 2005) 효율을 계산하였다.

### 1) 실험1 : 동결용기별 효율

닭 원시생식세포를 동결할 때의 동결용기는 0.25 mL 플라ستيك제 스트로(EcoStraw transparent, FHK, Japan), 0.5 mL 플라ستيك제 스트로(EcoStraw transparent, FHK, Japan) 그리고 동결용 튜브(NALGENE, Cat. No. 5100-0001)를 각각 이용해, 동결 및 용해 후의 원시생식세포 생존율을 통해 동결 용기별 최적의 효율을 비교 및 검토하였다.

### 2) 실험2 : EG와 PG의 동결 효율 비교

실험 1에서 최적의 동결용기 효율을 확인한 다음, 동결보호제 EG 및 PG 간의 동결 및 용해 후의 원시생식세포의 생존율을 확인했다.

## 5. 원시생식세포의 동결·용해 후의 생존율 측정

동결보호제의 동결과 용해의 기본용액은 0.5% 소혈청 알부민(Sigma)를 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Sigma)를 사용했다. 15% FBS를 기초로 EG 및 PG를 0%(대조군), 2.5%, 5%, 10% 그리고 15%를 첨가한 동결배지의 농도 조건으로 오계의 gPGCs를 동결 및 용해를 실시하였다. 동결용 튜브(Corning, Cat. No. 25723-1)에 4°C 조

건을 유지하면서 300  $\mu$ L의 동결배지에 원시생식세포 4~30 개를 주입하고, 4~5분 간 평형을 유지한 다음, 가능한 40초가 넘지 않도록 빨리 액체질소에 침지하였으며, 각각의 동결 용기에 넣은 후 액체 질소통에 옮기기까지 2분을 초과하지 않았다. 최소한 1달 후에, 액체질소 탱크로부터 동결 보존된 플라스틱제 스트로 및 동결용 튜브를 끄집어내어, 공기 중으로 약 5초 간 상온에 유지하고 나서 37°C 온탕에 3분 간 침지하여 용해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 mL 원심 분리용 시험관으로 옮겨서, EG 및 PG의 희석 제거를 위해서, 15% FBS + DMEM를 30초 간격으로 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 그리고 8 mL를 넣고, 각각 240 G에서 6분 간 원심분리를 하여 상층액과 함께 동결 보호제를 제거하였다. 세포는 125  $\mu$ L의 10% FBS + DMEM에 부유시켜, CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 38°C)에서 3시간 배양한 후에, 20  $\mu$ L를 빼내어 0.4% 트리판블루로 염색하여 생존율을 검토했다(Freshney, 2005). 또한 모든 유리화 실험은 8회에 걸친 반복을 실시하였다.

## 6. 통계분석

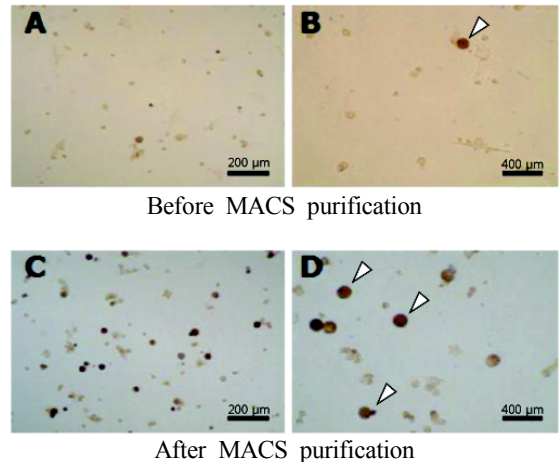
본 실험의 통계적 처리는 SAS package program(2000)를 이용하여 분산 분석을 실시하였으며, 처리 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다.

## 결 과

### 1. 실험 1 : 동결보존용기가 원시생식세포의 동결 및 용해 후 생존율에 미치는 영향

동결보존 용기로서 플라스틱제 스트로(0.25, 0.5 mL) 및 동결용 튜브를 이용한 유리화 방법을 이용한 동결 및 용해 후의 원시생식세포의 세포생존율을 확인하기 위하여 먼저, 초기배자의 발생 28 단계에서 채취한 원시생식 세포를 MACS 방법을 이용한 순수 분리 및 정제 전-후의 원시생식세포의 형태학적인 특징을 alkaline phosphatase(AKP) 염색한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. MACS 방법을 이용해 순수 분리하기 전의 원시생식 세포의 양상(A, B) 그리고 정제 후의 원시생식세포의 양상(C, D)을 확인하였다. 그리고 순수 분리 정제 효율을 Table 1에 각각 나타내었다. 원시생식세포의 동결 및 용해 후의 원시생식세포의 순도는 MACS 정제 전, 살아있는 체세포의 비율이 약 90.9%를 보이는데 반하여, 정제 후, 약 92%의 순도를 나타내었다. 그리고 생존한 원시생식세포의 비율은 약 87.5%를 보였다.

동결보존 용기에 따른 유리화 동결 및 용해 후의 원시생식



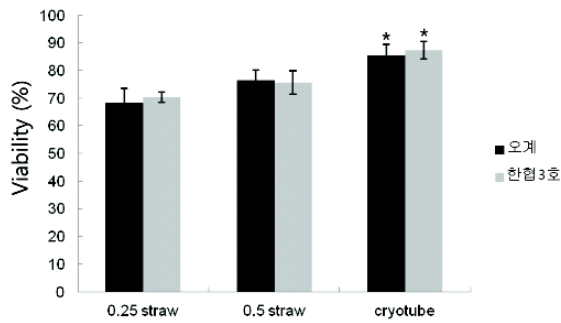
**Fig. 1.** Morphological characteristics of PGCs collected from germinal gonad of Ogye chicken embryos at stages 28 and alkaline phosphatase (AKP) stained PGC after cryopreservation. A (B) and C (D) show frozen-thawed PGCs with AKP staining, respectively. White arrowhead: AKP stained gPGCs. gPGCs: gonadal primordial germ cells. MACS : magnetic-activated cell sorting. Note the presence of AKP positive gPGCs (white arrowheads in B and D). B and D, high magnification of A (C). Scale bars = 200  $\mu$ m in A and C, 400  $\mu$ m in B and D.

**Table 1.** Efficient purity of PGCs from germinal gonad of Ogye chicken embryos by MACS purification.

Sources (embryonic age)	Protocol	Number of cells per embryo	Viable somatic cells (%)	NO. of PGCs released per embryo	Viable PGCs (%)
Embryonic gonads (5.5 day incubation)	MACS	$1.8 \times 10^4 \pm 0.1$ (150)	$90.9 \pm 3.8$	$92.0 \pm 4.6$ (150)	$87.5 \pm 3.2$

The purity is the ratio of PGCs in the total cell population. In 8 repeated experiments on 5.5-day-old embryos, the average purity of PGCs  $\pm$  SD was obtained.

세포의 세포생존의 비교를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저, 한국 재래닭(오계)품종의 경우, 0.25 mL 플라스틱제 스트로 사용 시, 68.23% 그리고 0.5 mL의 경우, 76.42%의 원시생식세포의 세포 생존율을 보였다. 플라스틱제 스트로 처리구 간에는 유의적인 차이는 없었지만, 직경이 두 배 큰 0.5 mL 사용 시, 생존율이 더 높음을 알 수 있었다. 동결용 튜브 처리군의 경우, 원시생식세포의 세포 생존율이 85.39%로 플라스틱제 스트로 처리군과 비교해서 유의적으로 높음을 확인하였



**Fig. 2.** Comparison of survival rates of vitrified-thawed PGCs according to the freezing vessel. Each column represents the mean  $\pm$  SE(n=8), \*  $p$ <0.05. EG: ethylene glycol. PG: propylene glycol.

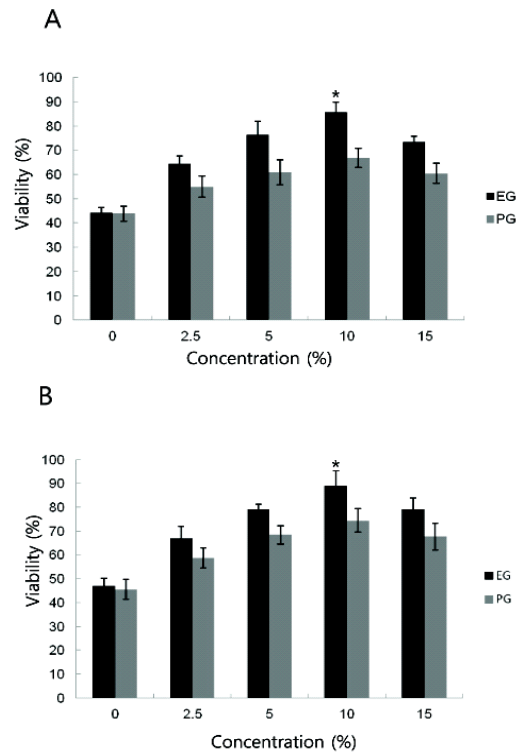
고, 본 연구에서의 유리화 동결 및 융해 실험을 수행하는데 있어서 가장 효율적인 동결용기는 동결용 튜브임을 확인하였다. 또한, 한국 재래닭으로 잘 알려져 있는 오계와 함께 상업용 닭으로 개량된 한국육종협회 3호 닭의 두 품종간의 유리화 동결 및 융해 후의 사용 동결 용기별 원시생식세포의 생존률은 비슷한 경향을 보였고, 두 품종 간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

**2) 실험 2 : EG와 PG의 동결 및 융해 후 생존율의 비교**

유리화 동결 및 융해 후의 EG 및 PG 첨가에 의한 동결보호제의 농도별 효율을 확인한 결과를 Fig. 3 A(오계) 그리고 B(한국육종협회3호)에 각각 나타내었다. 그 결과, 먼저 두 품종 간에 있어 대조구(0%)와 비교해 2.5, 5, 10 그리고 15%의 EG 및 PG 처리군에서 동결 및 융해 후의 세포 생존율이 높은 경향을 나타내었다. 또한, 2.5, 5, 10 그리고 15% 각각의 EG를 동결보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적( $p$ <0.05)으로 PG 처리군보다 동결 및 융해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히, 10% EG 처리군에서 85.63%로 동일한 농도의 PG 처리군(66.81%)보다 유의적( $p$ <0.05)으로 가장 높은 생존율을 보였다. 한편, 상업용 닭(한협3호)에서도 오계와 비슷한 경향의 결과를 확인하였다. 이상의 결과들로부터 유리화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 최적의 동결보호제로서 사용 가능함을 확인하였다.

**고 찰**

본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서, 먼저 오계의 원시생식세포 유리화 동결방법에 의한 동결 및 융해 후의 원시생식세포의 생존을 향상에 초점을 맞추고, 비교 및 검토



**Fig. 3.** The viability of PGCs after freeze-thaw following treatment with various combinations of cryoprotectant (EG and PG). Concentration (%) means the concentration of cryo-protectant (EG and PG). Each column indicates the mean  $\pm$  SE (n=8). EG : ethylene glycol. PG : propylene glycol.

하였다. 닭 원시생식세포 동결보존기술은 아직 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만, 무엇보다 성공적인 닭 원시생식세포의 동결보존의 핵심요소는 동결보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 동결보호제로 많이 사용되어온 EG, PG, DMSO, glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결 보호제와 당 또는 polyvinylpyrrolidone(PVP), 혈청알부민, 혈청 polyethylene glycol(PEG), ficoll 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비 침투성 동결보호제로 구분된다(Lovelock and Bishop, 1959; Boutron, 1984). 본 연구에서는 투과성(EG, PG) 및 비 투과성 억제제인 혈청알부민, 혈청을 가지고, 유리화 동결 및 융해 후의 닭 원시생식세포의 생존율에 관한 검토를 실시하였다. 본 연구에서도 EG를 동결 보호제로 사용해 유리화 한 처리군이 PG군보다 융해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 높았다. 특히, 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군이 다른 군과 비교해서 유의적으로 가장 높은 생존율을 확인했다. 이는 Friedler 등 (1988)이 세포 내로의 침투속도가 DMSO의 경우 20~30분

이며, glycerol 은 거의 60분 이상으로 매우 느린 것에 반해서, 분자량이 비교적 작고 세포막 투과성이 다른 동결 보호제에 비해 뛰어난 특성을 가진, EG의 경우 5~7분으로 가장 빠르다는 보고로부터 혹시, 빠른 침투에 의한 삼투압 평형에 도달한 결과, 삼투압 충격의 최소화 등에 기인해서 10% EG 처리군에서 닭 원시생식세포에 미치는 악영향을 최소화했을 가능성이 생각된다. 이는 Meryman et al.(2007)이 동결 속도, 삼투압에 의한 세포 손상 그리고 세포와 동결 보호제의 조합이 세포 동결 시에 중요한 요소라고 보고했는데, 닭 원시생식세포의 유리화 동결과정 중에서 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군이 삼투압에 의한 세포손상이 감소되었을 가능성이 생각된다. Bautista et al.(1998b)은 동결 보호제로서 EG이 포유동물의 생식세포인 난자의 유리화 동결에 가장 효율적이었다고 보고했다. 또한 EG를 이용하여 동결 보존한 난자 및 배아가 발생이 더 잘 진행되었다는 보고도 있다(Chi et al., 2002; Kim et al., 2004). 동결 방법과 세포의 종류가 조금씩 달라 본 연구의 결과와 직접적으로 비교하긴 힘들지만, PG와 DMSO의 경우에는 다른 동결 보호제에 비하여 확산속도가 느리며, 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가(Takase, et al., 1992), 세포 소기관 분열 및 세포분화 중 DNA 메틸화 등에 영향을 미치는 등과 같은 단점의 연구 결과들이 보고된 바 있다(Kotobuki et al., 2005; Rezazadeh et al., 2009).

성공적인 유리화 동결법을 수행하기 위해서는 동결보호 용액의 농도와 종류, 동결에 사용된 배아 및 세포의 질 등과 함께 중요한 요소 중에 하나인 유리화 동결을 위해 사용된 보관용기도 고려되어야 한다(Kasai et al., 2002). 본 연구에서 소, 돼지 그리고 닭 등의 정액의 동결에 많이 사용되는 플라스틱제 스트로와 함께 동결용 튜브를 이용해 유리화 동결 후의 닭 원시생식세포의 생존율에 관해서 조사를 하였다. 그 결과, 동결용 튜브를 보관용기로 사용했을 때가 세포 생존율이 가장 높은 것으로부터 닭 원시생식세포의 유리화 방법에 의한 동결 시에 보관용기로서 동결용 튜브가 최적임을 시사했다. 이전에 Naito et al.(1994)은 동결보호제로서 DMSO를 이용한 완만 동결법으로 40  $\mu$ L의 동결 보호제에 대해서 원시생식세포를 약 3,000개라고 하는 고밀도에서 동결보존을 실시하였기 때문에 세밀한 비교는 할 수 없었을 것으로 추정되며, 본 연구에서 이용된 원시생식세포의 유리화에 관한 결과와 직접적인 비교는 힘들지만, EG가 일반적으로 일반세포주의 동결에 동결 보호제로써 많이 이용되어 왔던 DMSO와 비슷하거나, 혹은 동결 및 용해 후의 세포 생존율이 보다 더 높을 가능성이 생각된다. 또한, 동일한 10%

의 농도의 EG를 동결보호제로 이용할 경우, 동결보존 용기로서 동결용 튜브를 사용한 군이 동결용 플라스틱 스트로 (0.25 mL 혹은 0.5 mL)군 보다 유리화 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 이것은 동결용 스트로의 벽이 더 얇기 때문에 온도 변화가 신속하게 전달되며, 세포에 대하여 정확한 온도 조절로 부하가 작을 것으로 예상되어, 동결튜브를 이용하는 결과보다 유리화 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 우수 할 것이라고 예상된 것과 상반되는 결과를 관찰하였다. 이는 오히려, 동결용 스트로 용기의 얇은 벽에 의하여 원시생식세포의 동결과정과 동결 후 보존과정 및 용해시의 온도변화에 따른 충격 등과 같은 환경적인 요인으로 인하여 닭 원시생식세포가 많은 손상을 입었을 가능성도 배제할 수가 없다. 동결용액이 노출되는 온도, 보관용기의 열전도율, 동결용액의 양, 연구자의 숙련도 그리고 배아 발달 시기 및 질 등이 생식세포 및 배아 등의 유리화 동결의 결과에 많은 영향을 미친다고 보고되고 있다(Kuleshova et al., 1999; Lee and Yoon, 2009; Saha et al., 1996). 최근에 열전도율을 증진시키는 방법 중 하나인 반고체 상태인 슬러시 상태의 질소(slushtnitrogen, SN<sub>2</sub>)를 사용하여 난자와 배아의 유리화 동결 후 생존율과 배아 발생의 증진을 보고한 연구도 있다(Arav et al., 2002; Yavin et al., 2009; Yoon et al., 2007). 하지만, 닭 원시생식세포에서는 미흡한 실정이다. 따라서 유리화 동결법이 더욱 효과적으로 널리 이용할 수 있게 하기 위해서는 유리화 동결액 성분의 세밀한 조합과 함께 다양한 동결방법의 비교·검토·과정 등의 전략이 반드시 추가되어야 할 것으로 생각된다.

닭 원시생식세포의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고, 더불어 수분함유량이 비교적 많아, 이를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 특히, 얼음결정의 형성을 근본적으로 피할 수 있는 유리화 동결법을 검토하였다. 이 방법은 세포를 급속히 동결시키고, 동결용액의 점성을 증가시켜 세포 내·외의 유리수가 비결정형으로 유지되는 동결법(Hey and MarFarlane, 1996)이다. 특히, 유리화 동결은 조작이 간단하고, 고가의 장비가 필요 없기 때문에 경제적으로 유익하다는 점이며, 앞에서 언급한 것과 같이 얼음결정이 원천적으로 형성되지 않아 상해를 최소화 할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서 유리화 동결 시, 동결보호제로 EG를 각각 0(대조군), 2.5, 5, 10, 15%의 비교적 낮은 농도를 사용했고, 특히 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군의 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 가장 높았다. 이는 동결 방법에 따라서 세포 내의 유리수를 침투성 동결보

호제와 교체하도록 유도한 다음, 천천히 냉각시켜 일정 온도에 도달한 후 세포질 내에 얼음결정이 형성되지 않도록 외부에 식빙을 하고, 충분히 낮은 온도에 도달하면 보존하는 완만 동결법은 2.0 M의 저 농도의 동결 보호제(Bautista et al., 1998a)를 사용한 결과와 유사한 경향을 보인다. 또한 Rall(1987)은 본 실험과 동일한 방법인 마우스의 배아의 유리화 동결 연구에서 유리화 동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 동결 및 용해의 과정에서 얼음 결정화(Miyake et al., 1993; Gardner and Lane, 2000)가 일어나 세포에 손상을 주기 때문에 이런 결정화가 일어나지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결 보호제를 사용했다고 보고하고 있다. 실험동물 중에서 가장 많이 이용되는 대표적인 포유류인 마우스의 배아와 조류인 닭 원시생식세포의 유리화 동결 연구 결과를 직접적으로 비교하는 것은 불가능하다. 하지만, 차후에 닭 원시생식세포 동결 보호제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포 독성을 줄이는 방법의 확립과 이를 통해 닭 원시생식세포 내 투과 속도가 높고, 독성이 적은 동결 보호제를 도입하거나, 투과성과 비 투과성 동결 보호제를 조합하여 상대적인 농도 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 방법을 통해서 최종적으로 닭 원시생식세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결 및 용해 후, 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고, 가장 광범위하게 사용되고 있는 세포 동결보호제로 알려져 있지만, 본 연구에서 닭 원시생식세포의 유리화 동결용액과 동결용기의 선택과 조합에 따라서 DMSO 뿐만 아니라, 동결 보호제로써 10% 농도의 EG도 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한 이번 실험 결과들로부터 닭 원시생식세포를 유전자원으로 영구 보존하기 위하여 동결용 스트로와 병행해서 동결용 튜브 모두 이용할 수 있음이 시사되었으며, 자동 세포 동결기(programmed freezer)와 같은 고가의 장비 없이도 경제적으로 유익하고 조작이 간단한 유리화 동결방법이 닭 원시생식세포 동결보존의 효율성을 증진시킬 것으로 기대된다. 만약, 동결된 닭 원시생식세포를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존율과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면, 동결 닭 원시생식세포의 생식계열 키메라를 이용한 한국 재래닭인 오계를 필두로 멸실 위기의 계통과 개체의 복원이 실용화 될 가능성이 높아지게 된다. 그러므로 닭 원시생식세포의 동결보존기술 향상에 의해 동결 및 용해 후의 많은 생존세포를 확보하는 방안과 닭 원시생식세포동결 보존기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

## 적 요

동결 닭 원시생식세포의 생식계열 키메라를 이용한 생체에의 복원을 실용화하기 위해서는, 닭 원시생식세포의 동결보존기술의 향상에 의해 동결 및 용해 후의 많은 생존세포를 확보하는 것이 반드시 필요하다. 닭 원시생식세포는 배양 5.5일령의 닭 원시생식선으로부터 채취하고, MACS 방법에 의해서 순수 닭 원시생식세포를 분리했다. 15% 각각의 EG를 동결보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적( $p<0.05$ )으로 PG 처리군보다 동결 및 용해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히, 10% EG 처리군에서 85.63%로 동일한 농도의 PG 처리군(66.81%)보다 유의적( $p<0.05$ )으로 가장 높은 생존율을 보였다. 한편, 상업용 닭(한협3호)에서도 오계와 비슷한 경향의 결과를 확인하였다. 이상의 결과들로부터 유리화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 최적의 동결 보호제로서 사용 가능함을 확인하였다.

(색인어 : 원시생식세포, 유리화동결, Ethylene Glycol(EG), Propylene Glycol(PG), 생존율, 오계)

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ00824-0032013)에서 연구비를 지원 받았습니다.

## 인용문헌

- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H 2002 New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 187:77-81.
- Bakst MR, Sexton TJ 1979 Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *J Reprod Fertil* 55:1-7.
- Bautista JA, Dela Pena EC, Katagiri S, Takahashi Y, Kanagawa H 1998a *In vitro* viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn J Vet Res* 46:13-18.
- Bautista JA, Kanagawa H 1988b Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals : ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet Res* 45: 183-191.

- Boutron P 1984 A more accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions : Comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21:183-191.
- Bryant G 1995 DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation. *Cryobiology* 32:114-128.
- Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS 2002 Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod* 17:2146-2151.
- Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML, Picazo RA 1996 Differences on post thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 33:502-507.
- Donnay I, Anquier P, Kaidi S, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P 1998 Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts : methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci* 52:93-104.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y 2000 Comparison of ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4 cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 15: 905-910.
- Freshney RI 2005 *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique*. 5th Edn Wiley-Liss Inc Hoboken.
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ 1988 Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 49:743-764.
- Gardner DK, Lane M 2000 Embryo culture systems In "Handbook of *in vitro* Fertilization". 2nd ed CRC Press, Boca Raton, FL 205-64.
- Gee GF, Bakst MR, Sexton TJ 1985 Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane. *J Wildl Manage* 49:480-484.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW 1995 Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 53:985-995.
- Hamburger V, Hamilton HL 1951 A series of normal stage in the development of the chick embryo. *J Morphol* 8:49-92.
- Han JY, Park TS, Hong YH, Jeong DK, Kim JN, Kim KD, Lim JM 2002 Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained *in vitro* for an extended period. *Theriogenology* 58:1531-1539.
- Hey JM, MacFarlane DR 1996 Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 33:205-216.
- Jiang JY, Umezumi M, Sato E 1999 Vitrification of two cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by *in vitro* fertilization in ethylene glycol based solutions. *Cryobiology* 38: 160-164.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T 1992 High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. *Biol Reprod* 46:1042-1046.
- Kasai M, Ito M, Edashige K 2002 Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 17:1863-1874.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera T, Sakurai T, Machida T 1990 A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89: 91-97.
- Kim JN, Kim MA, Park TS, Kim DK, Park HJ, Ono T, Lim JM, Han JY 2004 Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol Reprod Dev* 68:81-87.
- 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.
- Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H 2005 Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 11:663-673.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM 1999 Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38:119-30.
- Lee DR, Yoon TK 2009 Effect of slush-nitrogen on the cryopreservation of oocytes and embryos using vitrification. *Korean J Reprod Med* 36:1-7.
- Lovelock JE, Bishop MWH 1959 Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.



- Maeda T, Terada T, Tsutsumi Y 1984 Morphological observations on frozen and thawed Muscovy spermatozoa. *British Poultry Sci* 25:409-413.
- Meryman HT 2007 Cryopreservation of living cells : Principles and practice. *Transfusion* 47:935-945.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T 1993 Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene-glycol based solution by a simple method. *Theriogenology* 40:121-134.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M 1998 Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 13:2874-2879.
- Natio T, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y, Kuwana T 1994 Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J Reprod Fertil* 102:321-325.
- Naito M 2003 Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *Journal of Poultry Sci* 40:1-12.
- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM, Han JY 2003 Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod* 68:1657-1662.
- Petitte JN 2006 Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordal germ cells. *Poultry Sci* 85:237-242.
- Polge C 1951 Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature* 167:949-950.
- Rall WF, Fahy GM 1985 Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313:573-5.
- Rall WF 1987 Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG 1987 Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil* 80:499-504.
- Rezazadeh VM, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B 2009 Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 26:347-354.
- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T 1996 Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291-299.
- Scheffén B, Vanderzwalmen P, Massip A 1986 A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo Letters* 7:260-269.
- Shaw JM, Ward C, Trounson AO 1995 Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow cooled mouse pronuclear and 4 cell embryos. *Hum Reprod* 10:396-402.
- Takase K, Sawai M, Yamamoto K, Yata J, Takasaki Y, Teraoka H, Tsukada K 1992 Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines : kinetics of arrest and expression of the cell cycle marker proliferating cell nuclear antigen in Raji cells. *Cell Growth Differ* 3:515-521.
- Watanabe M, Kinutani M, Naito M, Ochi O, Takashima Y 1992 Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development* 114:331-338.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T 1992 A method to obtain germ-line chimeras using isolated primordial germ cells. *J Reprod Fertil* 96:521-- 528.
- Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A 2009 Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod* 24:797-804.
- Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY 2007 Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 88:952-956.
- 김현 양보석 고응규 김재환 최성복 김성우 2011 한국재래닭의 계통별 번식능력 비교. *한국동물번식학회지* 35:393-394.
- (접수: 2013. 8. 6, 수정: 2013. 9. 2, 채택: 2013. 9. 3)