

## 초자화 동결법을 이용한 닭 품종간의 원시생식세포 동결성적의 비교

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>†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

<sup>2</sup>서울대학교 동물자원학과

### Comparative Study on the Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cells using Vitriification in Chicken Breed

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>†</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 was conducted to establish the method for preserving PGCs that enables long-term storage in liquid nitrogen for developmental engineering or preservation of species. The purpose of this study is to clarify the effects of freeze-thaw treatment on viability of PGCs in chickens. PGCs were collected separately from a germinal gonad of an early embryo of 5.5~6 day (stage 28) of Isa brown, Korean Oge (KO), White Leghorn and Commercial breeds. PGCs separated from a germinal gonad of an early embryo of 5.5~6 day (stage 28) are suspended in a freezing medium containing a freezing and protecting agents (e.g. dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and glycerol). The PGCs were then purified using magnetic activated cell sorting (MACS) method. The viability of PGCs after thawing was  $87.4 \pm 0.4\%$  and  $89.4 \pm 0.2\%$  with the 10% EG treatments with no significant difference between the Isa brown and Commercial breeds. The viability of PGCs after freeze-thawing was significantly higher for Isa brown ( $87.4 \pm 0.4\%$ ) and Commercial breeds ( $89.4 \pm 0.2\%$ ) than Korean Oge (KO) ( $77.6 \pm 1.1\%$ ) and White Leghorn ( $76.2 \pm 0.9\%$ ) ( $p < 0.05$ ) using 10% EG cryoprotectant. This study established a method for pre-serving chicken PGCs that enables systematic storage and labeling of cryopreserved PGCs in liquid (LN<sub>2</sub>) at agerplasm repository and ease of entry into a data base. 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), vitriification, cryoprotective agents, viability, chicken breed)

## 서 론

이탈리아의 생리학자이며, 수사인 Spallanzani는 1776년 말 정자가 겨울 추위로 인하여 무활동 상태에 있다가 따뜻해졌을 때 운동성을 회복하는 것에 주목했던 것으로부터 세포의 활성화에 있어서 냉동(cooling)의 영향은 이미 200여 년 전부터 알려져 왔다. 그 후 포유류의 동결보존에 관한 연구는, 배아의 냉동에 관한 연구가 1972년 Whittingham이 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하여 완만 동결과 완만 융해로 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다

(Friedler et al., 1988; Whittingham et al., 1972). 동결보존 실험에서는 일반적으로 동해를 막기 위해 동결 보호제(cryoprotective agents : CPAs)를 사용하고 있으며, 그 동안 동결보호제로는 대개 투과성 동결보호제인 DMSO, PROH, glycerol을 사용하였다. 최근에는 ethylene glycol(EG)을 사용하는 경우가 늘고 있으며, 비투과성 보호제로는 glucose 또는 sucrose를 사용하고 있다(Ali et al., 1993; Kasai et al., 1990; Rall, 1987; Trounson and Mohr, 1983; Zhu et al., 1993; Kim et al., 1996). 동결보존 후 배아의 생존율은 동결 및 융해 과정 중에 사용되는 동결 보호제의 종류와 농도, 동결 방법과 융해 속도 등에 많은 영향을 받는다고 알려져 있다(Dumoulin

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

et al., 1994; Friedler et al., 1988; Mandelbaum et al., 1988; Nowshari et al., 1995). 또한 동결되는 배아의 세포주기, 발생 시기(Liu et al., 1993; Mandelbaum et al., 1988), 배아의 종(species)의 차이(Friedler et al., 1988)도 동결보존 후의 생존율과도 깊은 관계를 갖는다고 한다.

현재까지 배아의 동결 보존에는 자동 세포 동결기(programmed freezer)를 이용한 완만 동결법(slow freezing)이 주로 이용되었으나, 동결 시 세포 손상으로 생존율이 저하되는 단점이 있다. 1985년 Rall과 Fahy(Rall and Fahy, 1985)가 보고한 초 급속 냉동 방법인 초자화 동결법(vitrification)은 고농도의 동결 보호제를 사용하여 초 급속으로 냉각시켜 높은 냉각률과 응집력을 가지게 하는 방법으로써, 기존의 완만 동결과는 달리 동결 과정 중에 발생하여 세포 손상의 주 원인이 되는 빙결정(ice crystallization) 형성을 막으며, 동결에 소요되는 시간을 감소시키고, 기존의 자동 세포 동결기가 필요 없이 액화질소에 곧바로 침지함으로써 매우 경제적이면서 간편하다는 장점이 있다. 또한 초자화 동결용액의 주성분으로 쓰이는 EG는 탈수 효과가 커서 배아 동결 시 세포 내의 결정 형성(crystallization)을 줄여서 냉해로 인한 세포 손상을 줄일 수 있는 장점이 있으며, 완만 동결법보다 더 높은 생존율이 보고되었다(Kasai et al., 1990; Rall and Fahy, 1985). 지금까지 닭 원시생식세포 (primordial germ cells : PGCs) 동결 시에 동결 보호제로서 가장 보편적으로 사용되는 DMSO를 가장 많이 이용해 왔다(Naito et al., 1994; Tajima et al., 1998, 2003, 2004; Zhao and Kuwana, 2003; Mozdziak et al., 2005).

최근 연구자들은 가금류들 중에 일부가 멸종 위험에 처해 있고(Fulton and Delany, 2003), 치명적이고 잠재적인 전염병인 조류 인플루엔자 등으로부터 가금산업 전반적으로 위기에 직면해 있다고 보고했다(Blackburn, 2006). 일반적으로 가축의 생식세포 동결보존은 생체보존을 대체하여 유전자원을 보다 효율적이고 경제적으로 안전하게 보존할 뿐만 아니라, 증식효율을 조절할 수 있어 집단 관리에도 효과적으로 활용될 수 있다. 조류에서 생식세포의 동결보존은 미래의 가금 개량 그리고 희귀하거나 여러 가지 멸종 위험에 처한 종을 보호하기 위한 유전적인 물질을 보호하는데 필요하다. 또한 악성 질병 발생이나 사고 등의 멸종 위험(FAO, 2003)에 대비하여 생식세포의 동결보존 기술은 필수적 수단이다. 포유류의 경우, 유전자원 확보를 위해 동결 정액 보존 기술이 상용화되어 있고, 생명공학 기술의 발달로 배아줄기 세포의 확보 기술로 세포보존 또한 가능해졌다. 하지만 조류의 경우, 기술적 한계로 인하여 아직까지 동결정액 보존

기술이 상용화되어 있지 않다.

포유동물과는 달리 닭과 같은 가금류의 경우, 초기 배아의 발생학적, 형태학적 특이성 때문에 닭 배아생식세포를 조작하는 기술은 포유동물의 수정란과 같이 외래유전자를 주입하거나, 동결 보존하는 기술을 적용하기가 어렵다(Eyal-Giladi and Kochav, 1976). 가금류의 난자는 크고 깨지기 쉬우며 수정 시에 여러 개의 정자가 한꺼번에 수정되어 여러 개의 전핵의 존재로 수정란을 체외에서 동결보존하기가 불가능하며, 수정란에서도 배 발생에 이용되는 전핵을 인지하는 것이 매우 어렵기 때문이다. 가금류에서는 이러한 문제점을 극복하기 위해 성세포의 전구세포인 원시생식세포를 이용하여 생식세포 키메라를 생산하는 방법이 유전자원 보존 및 복원에 실시되고 있다(Watanabe et al., 1992). 포유류는 대부분의 유전자원 보존을 동결정액과 동결수정란으로 실시하고 있으며, 조류에서는 Park 등(2003)의 연구에서 보고된 바와 같이 embryonic germ cell(EGC)를 이용하거나 원시생식세포를 이용한 체외 배양법에 의한 형질전환동물을 생산하는 기법이 보고되었다. 조류에 있어서 원시생식세포는 외배엽을 통하여 배양 1일째가 되면 원시생식세포의 형태로 발현한 세포가 생식선반월로 모인다(Eyal-Giladi et al., 1981; Swift et al., 1914). 이렇게 모인 원시생식세포는 배자가 발달함에 따라 조류만의 특징인 배자 외 혈관계가 형성되기 시작하는 발생 13 단계(Hamburger-Hamilton et al., 1951)에 혈관계로 유입되고, 유입된 원시생식세포는 이동을 시작하여 원시생식기에 정착하게 된다. 이러한 특징은 외배에서 원시생식세포를 분리하여 이를 다시 초기 배자의 혈관에 주입시켜 생식선 키메라 닭 생산(Yasuda et al., 1992; Tajima et al., 1993; Park et al., 2003)이 가능하게 하였다. 지금까지 많은 연구자들이 배반엽세포와 초기 배자 발생 중의 한 단계인 혈액을 순환 중인 circulating PGC(cPGC)를 이용하여 동결에 관한 연구(Kino et al., 1997; Pokony, 2002; Yasuda et al., 1992)를 수행하였다. 본 연구와 동일한 발생단계인 생식선 유래의 gonadal PGC(gPGC)를 이용한 연구(Naito et al., 1994; Tajima et al., 1998; 2003; 2004; Zhao and Kuwana, 2003; Mozdziak et al., 2005)도 지속적으로 실시하였으나, 닭 유전자원으로써 닭 원시생식세포의 가장 안정적이고 효율적인 동결보존법에 대해서는 아직까지 명확하지가 않다. 그러므로 닭의 유전자원 보존을 위해서는 먼저 키메라 생산효율을 높이는 것이 중요하고, 이를 위해서는 가장 기초적인 닭 원시생식세포의 장기 동결 보존의 효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 이러한 내용들을 바탕으로 한국재래닭인 오계를 포함한 닭의 세 품종 간의 동결

및 용해 후의 생존 원시생식세포의 회수율 확인과 함께 최적의 동결보존법을 확립하는 것을 목적으로 연구를 진행하였다. 또한 다양한 품종들의 원시생식세포 동결 결과들은 향후 개체 및 계통 복원을 위한 키메라 생산효율을 향상시키는데 있어 기초 자료로써 매우 유용하게 활용될 수 있기를 기대한다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 시험계의 사양관리

본 실험에 사용된 공시계는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국재래닭 3원 교잡종과 가축유전자원시험장에서 보유하고 있는 44주령의 한국재래닭 오계(KO), 화이트트레그혼(WL), 이사브라운(IB)의 수탉에서 정액을 각각 채취하고, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13°C, 습도 70~85%의 종란 보관용 배양기에서 보관하였다. 다음 부화기에 입란하고 5.5~6일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 한국가금사양표준의 NRC 사양표준에 준한 시판 중계사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 그리고 남원시 소재의 일반양계 농가의 44~45주령의 한국육종협회 3호(상업용 닭 : C)의 수정란을 공급받아 시험에 공시했다. 또한, 모든 실험동물은 국립축산과학원의 실험동물 사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시되었다.

### 2. 실험군 설계

동결배지의 기초가 되는 혈청으로서 소태아 혈청(FBS)를 기초로 하고, 동결보호제로서 DMSO, EG 그리고 glycerol의 세 가지를 각각 사용하였다. 그리고 원시생식세포에 대해서, 0(대조군), 2.5, 5, 10, 15%를 첨가한 동결용 배지와 동결용 배지의 기초가 되는 혈청으로써 15% FBS를 기초로 하였다. 그리고 각 군의 원시생식 세포수는 약 200~300개 정도로 조절하고, 동결용기는 동결용 튜브(NALGENE, Cat. No. 5100-0001) 그리고 동결방법은 초자화법(급속 동결법)을 이용하고, 동결 및 용해 후의 원시생식세포 생존율 측정은 0.4% trypan blue 염색법(Freshney, 2005)을 이용해 서로 비교 검토하였다.

#### 1) 실험 1 : 동결배지의 농도별 효율

닭의 원시생식세포를 동결할 때의 동결배지의 기초가 되는 혈청으로 15% FBS를 기본으로 하고, 동결 보호제는 DMSO, EG 그리고 glycerol의 농도를 0(대조군), 2.5, 5,

10 그리고 15%로 조정된 실험구를 설정한 후 동결 및 용해 후의 원시생식세포의 생존율을 통해 동결배지의 농도별 최적의 효율을 비교 및 검토하였다.

#### 2) 실험 2 : EG, DMSO, Glycerol의 동결 효율 비교

실험 1에서 최적의 농도별 효율을 확인한 다음, 한국재래 닭인 오계와 화이트트레그혼종, 이사브라운종 그리고 상업용으로 육종화된 한국육종협회3호 닭 품종 간의 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율을 각각 확인했다.

### 3. PGCs의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 사육 중인 실험 축을 사용하여 Hamburger and Hamilton(1951)의 배 발달 단계에 기초하여, 37.8°C, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 발생 초기 배자로부터 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 배양접시에 옮긴 후, 실체 현미경(SZH : Tokyo, Japan) 하에서 예리한 핀셋을 이용하여 원시생식선 부분만을 분리한 후, MACS 법에 의해 분리 및 순수 정제를 하기 위해 이를 1.5 mL 튜브에 수집하여 실온에 두었다.

### 4. 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) trypsin 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣어 두었다(Park, 2003). 그리고 튜브는 37.8°C에 2분 간 배양 처리를 했다. Trypsin 처리 후, trypsin-EDTA의 불활성을 위해서 10% fetal bovine serum (FBS : Sigma, St. Louis, MO, USA)을 처리하였다. 큰 세포 다발 그리고 분해되지 않은 조직의 단편들을 제거하기 위해서 세포 부유액은 20  $\mu$ m 격자크기의 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 PGCs(gPGCs)를 순수 분리 및 정제하였다(Kim 등, 2004). 원심분리 후, 생식선세포(한 개의 tube당  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ )는 SSEA-1 항체를 이용하여 MACS 방법으로 순수 gPGCs를 정제하였다. 닭 생식선 유래 세포 혼합물을 PGC-specific antibody로 알려진 anti-stage specific embryo antigen(anti-SSEA)-1 antibody(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 세포 괴를 rat anti-mouse IgM microbeads 20 µL가 포함된 100 µL MACS buffer와 천천히 혼합하여 4°C에 15분 간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500 µL buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정을 한 후 MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다(Kim et al., 2004).

##### 5. PGCs의 동결 및 용해 후의 생존율 측정

동결 보호제의 동결과 용해의 기본용액은 0.5% 소혈청 알부민(Sigma)을 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Sigma)를 사용하였다. 15% FBS를 기초로 EG, DMSO 및 glycerol을 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 조건을 유지하면서 300 µL의 동결배지에 원시생식세포 6~40개를 주입하고, 4~5분간 평형을 유지한 다음, 가능한 30~40초가 넘지 않도록 빨리 액체질소(LN<sub>2</sub>)에 침지하였으며, 동결용 튜브에 넣은 후 액체질소(LN<sub>2</sub>)통에 옮기기까지 1분 30초~2분을 초과하지 않았다. 최소한 1~2달 후에 액체질소(LN<sub>2</sub>)탱크로부터 동결 보존된 동결용 튜브를 꺼내어 공기 중에서 약 5초 간 상온에 유지하고, 37°C 온탕에 3분 간 침지하여 용해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 mL 원심분리용 시험관으로 옮겨서 DMSO, EG 및 glycerol의 희석 제거를 위해서 15% FBS + DMEM를 30초 간격으로 100 µL, 100 µL, 100 µL, 200 µL, 1,000 µL 그리고 8 mL을 넣고 각각 240 g에서 6분 간 원심분리를 하여 상층액과 함께 동결 보호제를 제거하였다. 세포는 125 µL의 10% FBS + DMEM에 부유시켜 CO<sub>2</sub>배양기(5% CO<sub>2</sub>, 38°C)에서 3시간 배양한 후에 20 µL를 취한 후 0.4% trypan blue로 염색하여 trypan blue exclusion 방법에 의거하여 생존율을 검토하였으며(Freshney, 2005), 모든 초자화 실험은 8회에 걸친 반복테스트를 실시하였다.

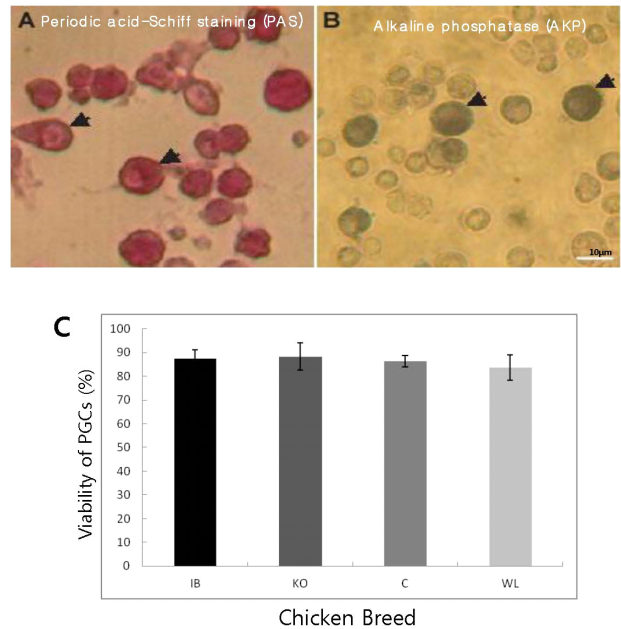
##### 6. 통계분석

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

## 결 과

##### 1. MACS 정제 전, 후의 원시생식세포 생존율 비교 분석

동결보존용기로서 동결용 튜브를 이용한 초자화 방법을 이용한 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 세포생존율을 확인하기 위하여 먼저 초기배자의 발생 stages 28단계에서 채취한 닭 원시생식세포를 MACS 방법을 이용한 순수 분리 및 정제 전-후의 닭 원시생식세포의 형태학적인 특징을 alkaline phosphatase(AKP)와 periodic acid-Schiff Staining(PAS)를 염색한 결과를 각각 Fig. 1 A, B에 나타내었다. 그리고 순수 분리 정제 효율을 Fig. 1 C에 나타내었다. 닭 원시생식세포의 동결 및 용해 후의 원시생식세포의 순도는 MACS 정제 전, 살아있는 체세포의 비율이 이사브라운종(92.7 ± 0.9%), 오계종(92.1 ± 1.8%), 한국육종협회3호종(94.9 ± 1.5%) 그리고 화이트레그혼종(91.9 ± 0.7%)임을 확인 하였다. MACS 정제 후의 닭 원시생식세포의 생존비율은 아사브라운종(87.5 ± 0.1%), 오계종(88.3 ± 1.1%), 한국육종협회3호종(86.3 ±



**Fig. 1.** (A) and (B) : Morphological characteristics of PGCs and Periodic acid-Schiff(PAS) and alkaline phosphatase(AKP) stained PGC after cryopreservation. Black arrowhead : PAS and AKP stained live PGCs. (C) : Efficient purity of PGCs from germinal gonad of IB, KO, C and WL chicken embryos by MACS purification. 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 ± SD was obtained. PGCs : primordial germ cells. MACS : magnetic-activated cell sorting. The scale bar means 10mm. IB : Isa Brown, KO : Korean Oge, C : Commercial chicken, WL : White Leghorn.

0.9%) 그리고 화이트레그혼종(83.6 ± 1.8%)임을 확인하였다. 한국재래품종인 오계에서 원시생식세포의 정제율이 가장 높았으나, 네 품종 간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 네 품종에 관계없이 평균 86.4%의 정제효율을 확인했다.

2. 동결배지의 농도별 효율 및 동결 보호제에 따른 원시생식세포 생존율 비교 분석

동결 시, 용액중의 동결 보호제 EG, DMSO 그리고 glycerol 첨가에 의한 동결배지의 각각의 농도별 동결 및 용해 후의 이사브라운(A), 오계(B), 상업용 닭(C) 그리고 화이트레그혼(D)의 네 품종 각각의 원시생식세포의 생존효율을 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 10% DMSO, EG 그리고 glycerol의 처리구가 나머지 2.5, 5, 15%의 처리구보다 원시생식세포의 생존율이 네 품종에 상관없이 높음을 확인했다. 또한, 네 품종에 있어 동결보호제 10% EG와 10% DMSO 처리구 간에는 유의적( $p < 0.05$ )인 차이는 보이지 않았지만 10% glycerol 처리구에 비해 세포생존율이 유의적( $p < 0.05$ )으로 높음을 확인했다. 특히 10% EG+FBS 조합의 처리군에서 상업용 닭(C : 89.4 ± 0.2%)과 이사브라운(A : 87.4 ± 0.4%)의 두 품종이 오계(B : 77.6 ± 1.1%) 및 화이트레그혼(D : 76.2 ± 0.9%)의 두 품종보다 동결 및 용해 후의 닭 PGCs의 생존율이 유의적( $p < 0.05$ )으로 높음을 Fig. 3에서 확인하였다. 이

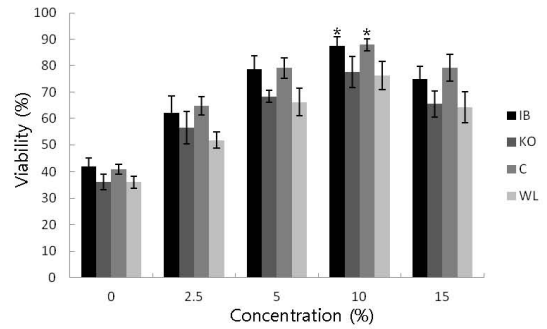


Fig 3. Percentage of PGCs that is viable by cyroprotectant EG treatment. Each column represents the means ± standard error(SE)(n=8). \*  $P < 0.05$ (compared with Control). IB : Isa Brown, KO : Korean Oge, C : Commerical chicken, WL : White Leghorn. EG : ethylene glycol.

상의 결과들로부터 10% EG + FBS와 10% DMSO + FBS조합의 두 처리구 간에 동결 및 용해 후의 세포생존율의 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 동결 배지의 농도별 효율의 높음은 확인하였다. 또한 네 품종간의 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포 생존효율의 비교에서는 상업용 닭, 이사브라운, 오계 그리고 화이트레그혼 품종 순으로 생존율이 높음을 확인하였다.

고 찰

생식계열 키메라를 이용해서 한국재래닭(오계) 복원을 할 경우 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율 향상과 키메라 제작 효율의 향상이 먼저 절대적으로 필요하다고 생각된다. 이러한 이유로 본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서 먼저 오계를 필두로 이사브라운, 화이트레그혼종 그리고 상업용 닭의 네 품종의 닭 원시생식세포 초차화 동결방법에 의한 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율의 향상에 초점을 맞추고 비교, 확인하였다. 닭 원시생식세포 동결보존기술은 아직 그 효율성이 확실하지 않고 문제점도 많지만, 무엇보다 성공적인 닭 원시생식세포의 동결보존의 핵심요소는 동결 보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 이와 같이 동결 및 용해가 세포에 주는 손상을 최소화하기 위해 동결 보호제는 매우 중요한 역할을 하지만, 그 동결 보호제의 독성 또한 세포에 손상을 줄 수 있다. 동결보호제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 상해로 나눌 수 있다 (Newton et al., 1999). 생식세포에 끼치는 동결 보호제 독성은 아직도 밝혀지지 않은 것들이 많지만, Kuleshova 등 (2001)은 동결 보호제의 독성을 줄이기 위해서는 동결 보호

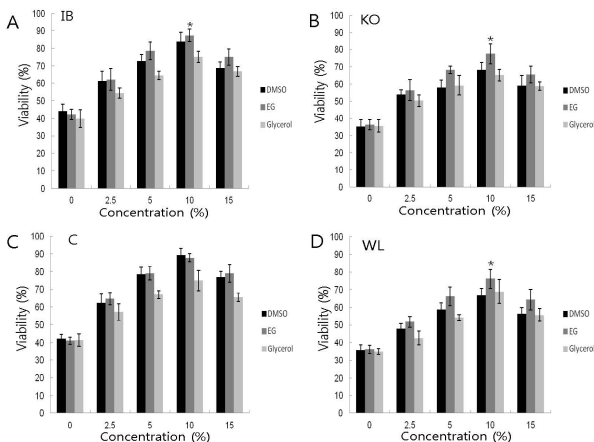


Fig 2. The viability of PGCs after freeze-thaw following treatment with various combinations of cyroprotectant (EG, DMSO and glycerol) among Chicken Breed. Concentration(%) means the concentration of cyroprotectant (EG, DMSO and glycerol). Each column indicates the means ± SE standard error (SE) (n=8). \*  $P < 0.05$ (compared with Control). IB : Isa Brown, KO : Korean Oge, C : Commerical chicken, WL : White Leghorn. EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, glycerol.

제에 노출 시간을 최소한도로 줄여야 한다고 주장하였다. 일반적으로 수정란과 같은 단세포 동결 시 동결 보호제 처리 시간은 20분 미만이다. 그러나 난소와 같은 다양한 크기의 여러 세포로 이루어진 조직은 동결 보호제 노출 시간이 30분 이상 되어야 적절한 동결 보호제 침투를 이룰 수 있다 (Newton et al., 1999). 닭 원시생식세포의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고, 수분 함유량이 비교적 많아, 이를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 특히 얼음 결정의 형성(Sutton, 1991; Gardner and Lane, 2000)을 근본적으로 피할 수 있는 초자화 동결법을 검토하였다. 이 방법은 세포를 급속히 동결시키고 동결용액의 점성을 증가시켜, 세포 내·외의 유리수가 비결정형으로 유지되는 동결법(Hey and MarFarlane, 1996)이다. 특히 초자화 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.

일반적으로 동결 보호제의 역할은 동결 시 생기는 얼음 결정 및 고농도 용매에 의한 세포 손상을 막는 것이다. 동결 보호제로 많이 사용되어온 EG, DMSO 그리고 glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결 보호제(permeable CPA)와 당(sugars) 또는 polyvinylpyrrolidone(PVP), 혈청알부민(serum albumin), 혈청(serum), polyethylene glycol (PEG), ficoll 등과 같은 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비침투성 동결 보호제(non-permeable CPA)로 구분된다(Lovell and Bishop, 1959; Boutron, 1984). 본 연구에서는 투과성(EG, DMSO, glycerol) 및 비 투과성 억제제인 혈청알부민(serum albumin), 혈청(serum)을 이용하여 초자화 동결 및 용해 후의 닭 원시생식세포의 생존율에 관한 검토를 실시하였다. 그 결과, 초자화 동결 시 동결보호제로 EG, DMSO 그리고 glycerol을 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 Friedler 등(1988)이 세포 내로의 침투속도가 DMSO의 경우 20~30분이며, glycerol은 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 빠른 침투에 의한 삼투압 평형에 도달한 결과, 삼투압 충격의 최소화 등에 기인해서 10% EG 처리군에서 닭 원시생식세포에 미치는 손상의 최소화 가능성이 고려된다. 이는 Meryman 등(2007)이 동결속도, 삼투압에 의한 세포 손상 그리고 세포와 동결보호제의

조합이 세포 동결 시에 중요한 요소라고 보고했는데, 닭 원시생식세포의 초자화 동결과정 중에서 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군이 삼투압에 의한 세포 손상이 감소되었을 가능성이 유추된다. Bautista et al.(1998)은 동결보호제로서 EG 이 포유동물의 생식세포인 난자의 초자화 동결에 가장 효율적이었다고 보고했다. 또한 EG를 이용하여 동결보존한 난자 및 배아가 발생이 더 잘 진행되었다는 보고도 있다(Chi et al., 2002; Kim et al., 2004). 동결 방법과 다양한 세포의 종류가 달라 본 연구의 결과와 직접적으로 비교 및 해석하기 힘들지만, DMSO와 glycerol의 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 methylation 등에 영향을 미치는 등과 같은 네거티브한 연구 결과들이 보고된 바 있다(Kotobuki et al., 2005; Rezazadeh et al., 2009).

본 연구 결과와 비교해 Moore 등(2006)이 10% EG를 이용한 화이트레그혼의 원시생식세포의 동결 및 용해 결과(74.3% ± 3.3)와 본 연구 결과(76.2% ± 0.9)가 비슷한 경향을 보였다. 오계를 필두로 나머지 세 품종의 동결 및 용해 후의 생존율은 Moore 등(2006)의 결과와 간접적으로 비교해서 더 높은 생존율을 나타냄을 보였다. 또한 Rall 등(1987)은 본 실험과 동일한 방법인 마우스의 배아의 초자화 동결 연구에서 초자화 동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에, 동결 및 용해의 과정에서 얼음 결정화(Miyake et al., 1993; Gardner et al., 2000)가 일어나 세포에 손상을 주기 때문에 이런 결정화가 일어나지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결 보호제를 사용했다고 보고하였다. 실험동물 중에서 가장 많이 이용되는 대표적인 포유류인 마우스의 배아와 조류인 닭 원시생식세포의 초자화 동결 연구 결과를 직접적으로 서로 비교 및 해석하는 것은 불가능하다. 하지만 차후에 닭 원시생식세포 동결보호제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포독성을 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 초자화 동결 및 용해 후 동결 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

성공적인 초자화 동결법을 수행하기 위해서는 동결보호용액의 농도와 종류, 동결에 사용된 배아 및 세포의 질 등과 함께 중요한 요소 중에 하나인 초자화 동결을 위해 사용된 보관용기도 고려되어야 한다(Kasai et al., 2002). 본 연구에

서 소, 돼지, 닭 등의 정액의 동결에 많이 사용되는 플라스틱 스트로와 함께 동결용 튜브를 이용해 초자화 동결 후의 닭 원시생식세포의 생존율에 관해서 조사를 하였다. 그 결과, 동결용 튜브를 보관용기로 사용했을 때가 세포 생존율이 가장 높은 것으로부터 닭 원시생식세포의 초자화 방법에 의한 동결 시 보관용기로서 동결용 튜브가 최적임을 시사했다. 이전에 Naito 등(1994)은 동결보호제로서 DMSO를 이용한 완만 동결법으로 40  $\mu$ L의 동결 보호제에 대해서 닭 원시생식세포를 약 3,000개의 고밀도에서 동결보존을 실시하였기 때문에, 직접적이고 세밀한 비교는 할 수 없었을 것으로 추정되며, 본 연구에서 이용된 닭 원시생식세포의 초자화에 관한 결과와 직접적인 비교는 힘들지만, EG가 일반적으로 일반세포주의 동결에 동결 보호제로서 많이 이용되어 왔던 DMSO와 비슷하거나, 혹은 동결 및 융해 후의 세포 생존율이 보다 더 높을 가능성이 생각된다. 또한, 동일한 10%의 농도의 EG를 동결보호제로 이용할 경우, 동결보존용기로서 동결용 튜브를 사용한 군이 동결용 플라스틱 스트로(0.25 mL 혹은 0.5 mL)군보다 초자화 동결 및 융해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 유의적( $p < 0.05$ )으로 높은 수치를 나타내었다. 이것은 동결용 스트로의 벽이 더 얇기 때문에 온도 변화가 신속하게 전달되며, 세포에 대하여 정확한 온도 조절로 부하가 작을 것으로 예상되어 동결 튜브를 이용하는 결과보다 초자화 동결 및 융해 후의 닭 원시생식세포의 생존율이 더 우수할 것이라고 예상과는 상반되는 결과를 관찰하였다. 이는 동결용 스트로 용기의 얇은 벽에 의하여 닭 원시생식세포의 동결과정과 동결 후 보존과정 및 융해 시의 온도변화에 따른 충격 등과 같은 환경적인 요인 등으로 인하여 닭 원시생식세포가 많은 손상을 입었을 가능성도 배제할 수가 없다. 동결용액이 노출되는 온도, 보관용기의 열전도율, 동결용액의 양, 연구자의 숙련도 그리고 배아 발달시기 및 질 등이 생식세포 및 배아 등의 초자화 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(sluslnitrogen, SN<sub>2</sub>)를 사용하여 난자와 배아의 초자화 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 초자화 동결법이 더욱 효과적으로 널리 이용할 수 있게 하기 위해서는 초자화 동결액 성분의 세밀한 조합과 함께, 다양한 동결방법의 비교 검토 과정 등의 전략이 반드시 추가되어야 할 것으로 생각된다.

DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고 가장 광범위하게 사용되고 있는 세포 동결 보호제로 알려져 있지만, 본 연구에서 닭 원시생식세포의 초자화 동결용액과 동결용기의 선택과 조합에 따라서 DMSO뿐만 아니라, 동결 보호제로서 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, 자동세포 동결기(programmed freezer)와 같은 고가의 장비 없이도 경제적으로 유익하고 조작이 간단한 초자화 동결방법이 닭 원시생식세포 동결보존의 효율성을 증진시킬 수 있는 하나의 요인이라고 기대된다. 조류 유전자원 확보는 기존의 포유류에서 활용되고 있는 핵 이식 기술이 현재까지 불가능하여 체세포를 동결 보존하는 것으로는 유전자원 복원을 위한 대안이 될 수 없다. 또한 이미 포유류에선 상용화 되어 있는 동결정액 보존 기술의 경우 아직까지 높은 인공 수정 및 부화율이 보고되지 않아 역시 한계점을 지닌다. 만약 동결된 닭 원시생식세포를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존율과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면, 동결 닭 원시생식세포의 생식계열 키메라를 이용한 한국재래닭인 오계를 필두로 멸실 위기의 계통과 개체의 복원이 실용화 될 가능성이 높아지게 된다. 그러므로 닭 원시생식세포의 동결보존기술 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존세포를 확보하는 방안과 닭 원시생식세포 동결보존기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 향후 닭 원시생식세포의 동결보존은 형질전환 닭의 생산에 있어서 닭 원시생식세포의 유전자 도입 실험의 설계를 용이하게 계획하기 위하여 필수적인 기술로 추정되고, 기존의 생산된 형질전환 닭의 유전자원 보존을 위하여 형질전환 개체의 후대 종란의 원시생식세포를 보존하는 방안에서도 이용될 가능성이 높다.

## 적 요

동결 닭 원시생식세포의 생식계열 키메라를 이용한 생체에의 복원을 실용화하기 위해서는, 닭 원시생식세포의 동결보존기술의 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존세포를 확보하는 것과, 생식계열 키메라의 제작효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 닭 원시생식세포는 배양 5.5~6 일령의 닭 원시생식선으로부터 채취하고, MACS 방법에 의해서 순수 닭 원시생식세포를 분리했다. 15% 각각의 EG와 DMSO를 동결보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적( $p < 0.05$ )으로 glycerol 처리군보다 동결 및 융해 후의

세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히 10% EG + FBS 조합의 처리군에서 상업용 닭(C :  $89.4 \pm 0.2\%$ )과 이사브라운(A :  $87.4 \pm 0.4\%$ )의 두 품종이 오계(B :  $77.6 \pm 1.1\%$ ) 및 화이트트레그혼(D :  $76.2 \pm 0.9\%$ )의 두 품종보다 동결 및 융해 후의 원시생식세포의 생존율이 유의적( $p < 0.05$ )으로 높음을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 10% EG + FBS와 10% DMSO + FBS 조합의 두 처리구 간에 동결 및 융해 후의 세포생존율의 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 동결 배지의 농도별 효율이 높음을 확인했다. 또한 네 품종 간의 동결 및 융해 후의 닭 원시생식세포 생존효율의 비교에서는 상업용 닭, 이사브라운, 오계 그리고 화이트트레그혼 품종 순으로 생존율이 높음을 확인하였다. 초자화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 10% DMSO와 함께 최적의 동결보호제로서 사용 가능성을 확인하였다.

(색인어 : 원시생식세포, 초자화 동결법, 동결 보호제, 닭 품종, 생존율)

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ008240-032013)에서 연구비를 지원 받았습니다.

## 인용문헌

- Ali J, Shelton N 1993 Vitrification on preimplantation stages of mouse embryos. *Reprod Fertil* 98:459-465.
- 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.
- Bautista JA, DelaPena EC, Katagiri S, Takahashi Y, Kanagawa H 1998 *In vitro* viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn J Vet Res* 46:13-18.
- Blackburn HD 2006 The national animal germplasm program : Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poultry Sci* 85:210-215.
- Boutron P 1984 A more accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propandiol aqueous solutions : Comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21:183-191.
- 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.
- Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geradts JP, Evers JL 1994 The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zona pellucida and embryos. *Fertil Steril* 62:793-798.
- Eyal-Giladi H, Ginsburg M, Farbarov A 1981 Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morphol* 65:139-147.
- 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. *Dev Biol* 49:321-337.
- FAO 2003 World Watch List for Domestic Animal Diversity 3rd edition (Scherf BD ed.) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome.
- Freshney RI 2005 Culture of Animal Cell s: 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.
- Fulton JE, Delany ME 2003 Poultry genetic resources-operation rescue needed. *Science* 300:1667-1668.
- Gardner DK, Lane M 2000 Embryo culture systems. In Handbook of *in vitro* fertilization. 2nd ed, CRC Press Boca Raton FL pp. 205-264.
- Hamburger V, Hamilton HL 1951 A series of normal stage in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 8:49-92.
- Hey JM, MarFarlane DR 1996 Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 33:205-216.
- 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.



- Kim MK, Lee SJ, Uhm EY, Yoon SH, Park SP, Chung KS, Lim JH 1996 Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *Korean J Animal Reprod* 20(2):119-126.
- Kino K, Pain B, Leibo SB, Cochran M, 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* 38:119-130.
- Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO 2001 Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43:21-31.
- 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.
- Liu J, Van der Abbeel E, Van Steirteghem AC 1993 Assessment of ultra-rapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 8:1115-1119.
- Lovelock JE, Bishop MWH 1959 Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L 1988 Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod* 3:117-119.
- 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.
- Moore DT, Purdy PH, Blackburn HD 2006 A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poultry Sci* 85:1784-1790.
- Mozdziaik PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petite JN 2005 Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poultry Sci* 84:594-600.
- 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.
- Newton H, Pegg DE, Barrass R, Gosden RG 1999 Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocyte. *J Reprod Fertil* 117:27-33.
- Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JH 1995 Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Human Reprod* 10:3237-3242.
- Park TS, Hong YH, Kwon SC, Lim JM, Han JY 2003 Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ(EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 65:389-395.
- Pokorny P 2002 Obtaining chicken chimeras after injecting cryopreserved blastoderm cells into the subgerminal cavity of recipient embryos. *Anim Sci Pap Rep* 20:55-66.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG 1987 Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil* 80:499-504.
- Rall WF, Fahy GM 1985 Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rall WF 1987 Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- 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.
- Sutton RL 1991 Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday Trans* 87:101-105.
- Swift CH 1914 Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am J Anat* 135:51-70.

- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T 1993 Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40:509-519.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T 1998 Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGC) in chicken. *J Exp Zool* 280:265-267.
- Tajima A, Barbato G, Kuwana T, Hammerstedt RH 2003 Conservation of a genetically selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PCG) isolated by filtration method. *J Poult Sci* 40:53-61.
- Tajima A, Minematsu, T, Ohara, M 2004 Production of germ-line chimeras by the transfer of cryopreserved gonadal germ cells collected from 7- and 9- day old chick embryos. *J Anim Sci* 75:85-88.
- 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.
- Trounson A, Mohr L 1983 Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature* 305:707-709.
- 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.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P 1972 Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science NY* 187:411-414.
- 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.
- Zhao DF, Kuwana T 2003 Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci* 44:30-35.
- Zhu SE, Kasai M, Ootoge H, Sakurai T, Machida T 1993 Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 98:139-45.

(접수: 2013. 8. 13, 수정: 2013. 8. 29, 채택: 2013. 9. 2)