

한국재래닭 (오계) 원시생식세포에 있어 동결방법의 개선이 융해 후 생존율에 미치는 영향

김 현¹ · 김동훈¹ · 한재용² · 최성복¹ · 고응규¹ · 도윤정¹ · 성환후^{1*} · 김성우^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²서울대학교 동물자원과학과

The Effect of Modified Cryopreservation Method on Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cell on the Korean Native Chicken (Ogye)

Hyun Kim¹, Dong Hun Kim¹, Jae Yong Han², Sung Bok Choi¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Yoon Jung Do¹, Hwan-Hoo Seong^{1*} and Sung Woo Kim^{1*}

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

²WCU Biomodulation Major, Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to establish methods for preserving chicken primordial germ cells (PGCs) for long-term storage in liquid nitrogen and for developmental engineering or preservation of species. The purpose of this study is to clarify the effects of fetal bovine serum (FBS) or chicken serum (CS) treatment on the viability of cryopreserved PGCs from Korean Native Chicken (Ogye). PGCs separated from a germinal gonad of an early embryo at day 5.5-6 (stage 28) were suspended in a freezing medium containing freezing and protective agents (dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and glycerol). The values from 0, 5, 10, and 15 % DMSO plus FBS treatment were 21.6, 30.36, 36.42, 50.39, and 48.36 %, respectively. The viability of PGCs after freeze-thawing was significantly higher for 10% EG plus FBS treatment than for 10% EG + FCS treatment ($p < 0.05$) (64.36% vs. 50.66%). This study establishes a method for preserving chicken PGC that enables systematic storage and labeling of cryopreserved PGC in liquid nitrogen at a germplasm repository and an 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 to improve the production of germline chimeras.

(Key words : Primordial germ cells (PGCs), EG, Viability, Korean native chicken (Ogye), Slow freezing)

서 론

가축의 생식세포 동결보존은 생체보존을 대체하여 유전자원을 보다 경제적으로 안전하게 보존할 뿐만 아니라 증식효율을 조절 할 수 있어 집단 관리에도 효과적으로 활용될 수 있다. 조류에서 생식 세포의 동결보존은 미래의 가금개량 그리고 회귀 하거나 여러 가지 멸종 위험에 처한 종을 보호하기 위한 유전적인 물질을 보호하는데 필요하다. 또한 악성질병 발생이나 사고 등의 멸종위험에 대비하여 생식세포 동결보존기술은 필수적 수단이다.

가금류 정액의 동결보존은 벌써 닭 (Polge 등, 1951), 오리 (Maeda 등, 1984), 거위 그리고 칠면조 (Bakst와 Sexton, 1979)에 관한 연구가 진행되고 있다. 그리고 야생종의 조류, 예를 들어

두루미와 같은 조류 (Gee 등, 1985)도 정액동결 보존이 가능하다는 보고들이 있다. 그러나 Hammerstedt와 Graham의 연구 결과 (1992)에 의하면 동결된 정액을 이용하여 인공수정을 실시 할 경우 성공적인 수정율은 9~91% 범위의 큰 변이가 있다고 보고하였다. 또한 조류의 난자와 배자의 동결보존을 위한 효율적인 방법은 아직까지 보고된 바가 없으며 유전자원의 보존 방법이 확립되지 않은 영역으로 알려져 있다.

최근 멸종위험에 처한 가금의 많은 전문적인 연구들이 이루어지고 있다 (Fulton와 Delany, 2003). 게다가 Blackburn 등 (2006)은 경제적인 압박 그리고 잠재적인 전염병의 가능성으로부터의 상업용의 가금산업에 있어 가금류들의 생물학적인 보안은 위험해 직면해 있다고 보고 하고 있다. 가금류의 유전자원이 신축성이 있다고 할

* Corresponding author : Sung Woo Kim, Ph.D. Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea. Tel: 82-63-620-3524, Fax: 82-63-620-3591, E-mail: sungwoo@korea.kr

* Corresponding author : Hwan-Hoo Seong, Ph.D. Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea. Tel: 82-63-620-3521, Fax: 82-63-620-3591, E-mail: seonghh@korea.kr

지라도 소비자들의 다양한 가금류에 대한 기호도의 증가와 미래에 가금산업에 있어 새로운 유전자원의 필요성이 요구 된다. 또한 최근에 조류 인플루엔자와 같은 치명적인 전염병에 대한 걱정 등도 가금산업에 위협적인 요인으로 남아 있는 것이 사실이다. 동결-융해 후의 닭 정액의 수정율은 다른 종에 비해 현저히 떨어지고 (Chalah 등, 1999) 상업적으로 이용을 하기 위해서는 상당한 개선이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 결정적으로 닭 정액동결의 불리한 점은 수탉이 ZZ 염색체에 homogametic sex이기 때문에 미토콘드리아 DNA 그리고 W 염색체상의 유전자를 역류할 수가 없는 문제점이 있다. 그러므로 규모가 너무 크고 여러 세대에 걸친 육종 프로그램을 하지 않고서는 동결한 정액을 이용해 닭계통을 다시 복원하는 것은 거의 불가능하다. 이에 반하여 PGC 동결보존방법은 생식선 유래의 키메라닭의 제작을 통해서 단지 2세대 내에서 필요로 하는 계통을 복원을 할 수가 있는 장점이 있다.

포유동물과는 달리 닭과 같은 가금류의 경우 초기 배아의 발생학적, 형태학적 특이성 때문에 닭의 배아 생식세포를 조작하는 기술은 포유동물의 수정란과 같이 외래유전자를 주입하거나 동결보존하는 기술을 적용하기가 어렵다 (Eyal-Giladi와 Kochav, 1976). 즉, 가금류의 난자는 크고 깨지기 쉽고 수정 시에 여러 개의 정자가 한꺼번에 수정되어 여러 개의 전핵이 존재하여, 수정란을 체외에서 동결보존하기가 불가능하며, 수정란에서도 배발생에 이용되는 전핵을 인지하는 것이 매우 어려운 것으로 알려졌다. 가금류에서는 이러한 문제점을 극복하기 위해 성세포의 전구세포인 원시생식세포를 이용하여 생식세포 키메라를 생산하는 방법이 유전자원 보존 및 복원에 실시되고 있다 (Watanabe 등, 1992). 포유류는 대부분의 유전자원 보존을 동결정액과 동결수정란으로 실시하고 있으며, 조류에서는 Park 등 (2003)의 연구에서 보고된 바와 같이 Embryonic germ cell (EGC)를 이용하거나, 원시생식세포 또는 원시배반엽세포를 이용하거나 일부 체외배양법을 이용한 1 세포기 난자를 이용하여 형질전환동물을 생산하는 기법 (Shaw 등, 1992)이 보고되어 있다. 이식되는 세포는 생산된 개체에는 발현되지 않으나, 후대에 유전적 정보를 전달하는 키메라 성세포를 포함하고 있는 세포분자적 특성을 가지고 있다. 이러한 특징을 이용하여 동결보존된 PGCs는 유전자원으로서 세대를 거쳐 다음 자손에게 전달 할 수 있는 특징을 지니고 있는 세포이므로 개체와 계통을 복원할 수 있는 효율적인 방안을 제공할 수 있다. 조류에 있어서 원시생식세포는 외배엽을 통하여 배양 1일째가 되면 원시생식세포의 형태로 발전한 세포가 생식선반월로 모인다 (Eyal-Giladi 등 1981; Swift 등 1914). 이렇게 모인 원시생식세포는 배자가 발달함에 따라 조류만의 특징인 배자 외 혈관계가 형성되기 시작하는 발생 13단계 (Hamburger-Hamilton 등, 1951)에 혈관계로 유입된다. 그리고 유입된 원시생식세포는 이동을 시작하여 원시생식기에 정착하게 된다. 이러한 특징은 외배에서 원시생식세포를 분리하여 이를 다시 초기 배자의 혈관에 주입시켜 생식선 키메라 닭 생산 (Yasuda 등, 1992; Tajima 등, 1993; Park 등, 2003)이 가능하게 하였다. 그러나 지금까지 일부 연구자를 제외하고 대부분의 경우 키메라 닭의 생산 효율은 매

우 낮다. 최근 Naito 등 (1994)이 일부 개체에서 98%의 효율을 보인 것을 제외하고 Park 등 (2003)의 연구에서도 가장 좋은 효율일 경우가 50% 이상을 얻지 못하였다. 이것도 또한 평균 효율이 아닌 일부 개체에서만 나타나고 있다.

지금까지 많은 연구자들이 배반엽세포 (blastodermal cells)와 초기 배자발생 중의 한 단계인 혈액을 순환중인 cPGC (circulating PGC)를 이용하여 동결에 관한 연구 (Kino 등, 1997; Pokony 등, 2002; Yasuda 등, 1992)를 수행하였다. 본 연구와 동일한 발생단계인 생식선 유래의 PGC (gonadal PGC)를 이용한 연구 (Naito 등, 1994; Tajima 등, 1998; 2003; 2004) 도 지속적으로 실시하였으나 닭 유전자원으로서 세포를 동결 보존하는 방법에 대해서는 아직까지 명확하지가 않다. 닭 PGCs를 분리하는 연구에서 원시생식선 유래 PGCs의 숫자가 가장 많다고 보고되었으며 (Zhao와 Kuwana 등, 2003; Mozdziaik 등, 2005), 배양과정에서 PGCs는 세포 상호간 서로 뭉치는 경향을 가지고 있으며, 결국 배양액으로 부유하여 소실되는 경향이 많은 것으로 보고되었다 (D'Costa 등, 2001). 다양한 종류의 세포주들은 동결보존을 위하여 일반적으로 Dimethyl sulfoxide (DMSO)가 동결보호제로써 폭 넓게 많이 사용되어 왔으나 (Allioli 등, 1994; Zhao와 Kuwana 등, 2003; Mozdziaik 등, 2005) 최근 Kobayashi 등 (2003)은 DMSO 보다 Ethylene glycol (EG)이 PGCs를 보존하는데 동결보호제로써 더 우수하다고 보고한 바가 있다.

포유류의 경우 유전자원 확보를 위해 동결정액보존기술이 상용화되어 있고, 최근 생명공학 기술의 발달로 인해, 배아줄기세포 확립을 통해 세포보존 또한 가능해졌다. 하지만 조류의 경우 기술적 한계로 인하여 아직까지 동결정액보존기술이 상용화 되어 있지 않다. 또한 조류 배아 줄기세포의 경우, 생식선 키메라 생산능력이 보고된 바가 없어 한계점을 지닌다. 닭 원시생식세포의 경우 유전자 발현 연구 등의 특성화 연구가 잘 되어 있고 생식선 키메라 생산에 대한 보고가 많이 되어 있다. 하지만 키메라 생산 효율은 아직 미흡한 실정이다. 그러므로 닭의 유전자원 보존을 위해서 먼저, 키메라 생산효율을 높이기 위해서는 가장 기초적인 원시생식세포의 장기 동결 보존의 효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 그러므로 이 연구에서는 동결 및 융해 후의 생존 원시생식세포의 회수율이 높은 동결보존 조건 및 동결용 배지의 검토를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 시험계의 사양관리

본 실험에 사용된 공시계 (Kim 등, 2011)는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국재래닭 3원 교잡종과 가축 유전자원시험장에서 보유하고 있는 44주령의 한국재래닭 오계 (Ogye) 수탉에서 정액을 각각 채취하여 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13℃, 습도 70~85%의 종란 보관용 배양기에서 보관한 다음 부화

기에 입란하고 5.5일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 한국가금사양표준의 NRC 사양표준에 준한 시판 종계사료를 무제한 급여하였으며 기타 관리는 관행에 준하였다. 그리고 모든 실험동물은 국립축산과학원의 실험동물 사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시되었다.

2. 실험군 설계

동결배지의 기초가 되는 혈청으로서 소태아혈청(FBS)을 기초로 하고 동결보호제로서 DMSO와 EG를 사용하였다. 그리고 PGCs에 대해서, 0(대조군), 2.5, 5, 10, 15%를 첨가한 동결용 배지와 닭혈청(CS)을 기초로 동일한 농도 조건으로 동결 및 융해 후의 PGCs 생존율을 0.4% Trypan blue 염색법을 이용해 생존율을 비교 검토하였다.

실험 1: 동결배지의 농도별 효율 및 DMSO와 EG의 동결 효율 비교

닭의 원시생식세포를 동결 할 때의 동결배지의 기초가 되는 혈청으로 15% FBS와 같은 농도의 CS를 기본으로 하고, 동결보호제는 DMSO 및 EG의 농도를 0(대조군), 2.5, 5, 10 그리고 15%로 되게 조정한 실험구를 설정해, 동결 및 융해 후의 PGC의 생존율을 통해 동결배지의 농도별 최적의 효율을 비교 및 검토 하였다. 또한 동결보호제 DMSO 및 EG 간의 동결 및 융해 후의 PGCs의 생존율을 확인했다.

3. PGCs의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 사육중인 실험 축을 사용하여 Hamburger-Hamilton(1951)의 배 발달 단계에 기초하여, 37.8℃, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 원시생식선으로부터 분리방법은 5.5일(stage 28: (Hamburger와 Hamilton, 1951) 동안 배양한 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, MACS법에 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) 함유된 1.5 mL 원심 분리 튜브에 넣어 두었다. 그리고 튜브는 37.8℃에 2분간, 배양 처리를 했다. Trypsin 처리 후, trypsin-EDTA의 불활성을 위해서 10% fetal bovine serum(FBS: Sigma, St. Louis, MO, USA)를

처리하였다. 큰 세포 다발 그리고 분해되지 않은 조직의 단편들을 제거하기 위해서, 세포 부유액은 20 μ m 나일론 메쉬 필터(BD Falcon, Cell Strainer, USA)를 이용해서 필터를 하고, 200 g에 5분간 원심분리를 했다. MiniMACS(magnetic-activated cell sorting) system(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용해서 원시생식선 유래의 PGCs(gPGCs)를 순수 분리 및 정제 하였다(김 등, 2004). 원심분리 후, 생식선세포(한 개의 tube 당 3×10^6 에서 5×10^6)는 SSEA-1 항체를 이용해서, 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℃에서 20분간 반응을 시켰다. PBS에 0.5% BSA와 2 mM EDTA가 함유된 1 mL MACS buffer로 세정을 하고, 200 g에 5분간 원심분리 하고 나서 상층액을 완전히 제거한다. 아래에 침전된 세포괴를 rat anti-mouse IgM microbeads 20 μ L가 포함된 100 μ L MACS buffer와 천천히 혼합하여 4℃에 15분간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500 μ L buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정을 하고 나서, MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다(Kim 등, 2004).

5. 원시생식세포의 동결 및 융해 후의 생존율 측정

15% FBS를 기초로 EG 및 DMSO를 0 %(대조군), 2.5 % 5 %, 10 % 그리고 15%를 첨가한 동결배지와 CS 혹은 FBS를 각각, 기초로 한 동일한 동결배지의 농도 조건으로 오계의 gPGCs를 동결 및 융해를 실시하였다. 동결용 튜브(Corning, Cat. No. 25723-1)에 4℃ 조건을 유지하면서 300 μ L의 동결배지에 PGCs 4~30개를 주입하고, Cryo Freezing Container(NALGENE, Cat. No. 5100-0001)를 이용해서, 분당 -1℃ 냉각속도로 동결을 실시하기 위하여 -85℃ 초저온 냉동고에서 12~18시간 유지 하였다. 그 다음날 액체질소(-196℃) 탱크에 보관하였다. 최소한 1달 후에, 액체질소 탱크로부터 동결용 튜브를 끄집어내어, 곧바로 37℃ 온탕에 3분간 침지하여 융해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 mL 원심분리용 시험관으로 옮겨서, DMSO 및 EG의 희석제거를 위해서, 10% FBS + DMEM 그리고 10% CS + DMEM를 30초 간격으로 100 μ L, 100 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L 그리고 8 mL을 넣고, 각각 240 G에서 6분간 원심분리를 하여 상층액을 제거했다. 세포는 125 μ L의 10% FBS + DMEM 그리고 10% CS + DMEM에 부유시켜, CO₂ 배양기(5% CO₂, 38℃)에서 3시간 배양한 후에, 20 μ L를 빼내어 0.4% Trypan blue 염색하여 Trypan blue exclusion method 방법에 의거하여 생존율을 검토하였다(Freshney 등, 2005).

6. 통계분석

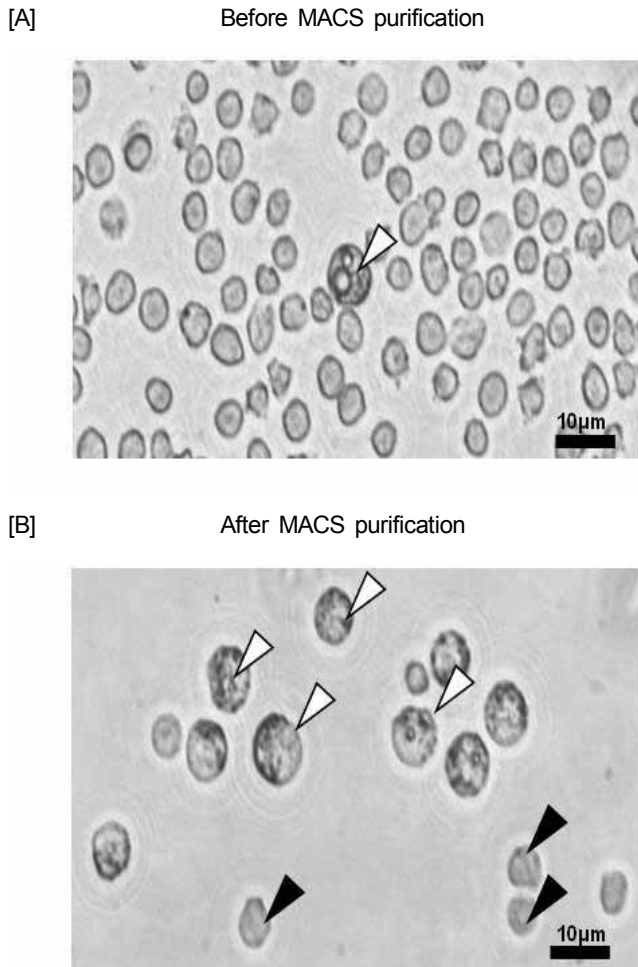


Fig. 1. Morphological characteristics of PGCs and trypan blue stained PGC after cryopreservation. [A]: PGCs collected from germinal gonad of Ogye chicken embryos at stages 28 before MACS purification. [B]: Frozen thawed PGCs with Trypan blue staining after MACS purification. Black arrowhead: trypan blue unstained live PGCs. White arrowhead: trypan blue stained dead PGCs. PGCs: Primordial Germ Cells. MACS: magnetic activated cell sorting. The scale bar means 10 μ m.

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

1. 동결배지의 농도별 효율

PGCs의 동결 및 용해 후의 세포생존율을 확인하기 위하여 먼저, 초기배자의 발생 stages 28 단계에서 채취한 PGCs를 MACS 방법을 이용한 순수 분리 및 정제 전-후의 PGCs의 형태학적인 특징을 Trypan blue 염색한 결과를 Fig. 1, 순수 분리 정제 효율을 Table 1에 각각 나타내었다. PGCs의 순도는 MACS 정제 전, 6.4 %를 보인데 반하여, 정제 후, 약 86%의 순도를 나타내었다. 그리고 동결 시, 용액중의 EG 및 DMSO 첨가에 의한 동결배지의 농도별 효율을 확인한 결과를 Table 2에서 나타내었다. 대조구 (0%)와 비교해 2.5, 5, 10 그리고 15%의 EG 및 DMSO 처리구에서 동결 및 용해 후의 세포 생존율이 높은 경향을 나타내었다. 특히, 10% EG+FBS군에서 64.36% 그리고 10% EG+CS군에서 50.66%의 동결 및 용해 후의 세포생존율을 확인했다. 한편, 동결 보호제로써 DMSO를 사용한 처리구의 결과는 15% DMSO+FBS군에서 50.39% 그리고 15% DMSO+CS군에서 PGCs의 생존율이 48.32%를 각각 확인을 했다. FBS 혹은 CS 처리에 상관없이 동결보호제로서 EG사용 시, 동결 및 용해 후의 생존율이 DMSO 처리구 보다 더 높음을 확인했다. 즉, 10% EG+FBS 조합의 동결배지의 처리구가 10% EG+CS군, 15% DMSO+FBS군 그리

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

Sources (embryonic age)	Purity of PGCs (%) ¹⁾	
	A	B
Embryonic Gonad (5.5 day)	6.431 \pm 0.062	86.1 \pm 0.19

¹⁾ 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. A: before MACS purification and B: after MACS purification.

Table 2. Viability of chicken PGCs after freeze-thaw following treatment with cryoprotectants

Treatment (cryoprotectants)	Concentration (%)				
	0	2.5	5	10	15
DMSO / FBS	21.06	30.36	36.42	48.36	50.39
EG / FBS	22.36	40.12	42.96	64.36*	55.36

Percentage of PGCs that is viable by cryoprotectant (EG or DMSO) treatment. Each column represents the mean \pm SE (n=8).

* P < 0.05. EG: ethylene glycol DMSO: Dimethyl sulfoxide.

Table 3. Viability of chicken PGCs after freeze-thaw following treatment with cryoprotectants

Treatment (cryoprotectants)	Concentration (%)				
	0	2.5	5	10	15
DMSO/CS	20.33	34.56	37.48	48.06	48.32
EG/CS	23.53	38.36	41.48	50.66	50.21

Percentage of PGCs that is viable by cyroprotectant (EG or DMSO) treatment. EG: ethylene glycol DMSO: Dimethyl sulfoxide.

고 15% DMSO + CS군 보다 동결효율이 더 높은 결과들로부터 10% EG + FBS의 동결 배지가 최적의 조합임을 확인했다.

고 찰

생식계열 키메라를 이용해서 한국 재래닭(오계) 복원을 할 경우 동결 및 융해 후의 PGCs의 생존율 향상과 키메라 제작 효율의 향상이 먼저 절대적으로 필요하다고 생각된다. 그래서 본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서, 먼저 오계의 원시생식세포 동결방법의 개선에 의한 동결 및 융해 후의 PGCs의 생존율 향상에 초점을 맞추고, 혈청이 미치는 영향에 대해서 비교 및 검토하였다.

원시생식세포의 동결용액에는 동결보호제로써 일반적으로 세포배양에서 많이 사용되는 EG 및 DMSO를 사용하고, 세포 비 침투성의 세포 보호제로서 기능을 하는 FBS 및 CS를 각각 첨가했다. 본 연구에서는 10% EG + FBS의 처리군이 다른 조합의 처리군 들 보다 유의적으로 (64.36%) 동결 및 융해 후의 생존율이 높은 최적의 조합을 확인했다. 지금까지 닭의 PGCs 동결시에 동결보호제로써 일반적으로 가장 보편적으로 사용되는 DMSO를 가장 많이 이용해 왔다(Naito 등, 1994 Tajima 등, 1998, 2003, 2004). 하지만 흥미롭게도 최근에 Kobayashi 등(2003)은 DMSO 보다 항동해제로서 EG 사용 했을 때 동결 및 융해 후의 PGCs 생존율(73%)이 더 우수하다고 보고 했는데 본 연구의 결과와도 일치함을 알 수 있었다. 이는 FBS 중의 극소량 성분이 동결 전 그리고 융해 후의 세포들에게 있어선 영양첨가인자로써의 기능을 할 가능성이 존재한다. 이런 결과들로부터 FBS의 첨가는, 융해 후의 닭 원시생식세포 생존율을 크게 향상시키는데 유효할 가능성이 높다고 추정된다. 더욱이 본 연구의 결과들로부터 동결배지의 기초배지로서 FBS 뿐만 아니라 CS도 이용 가능하나 CS 보다도 FBS를 첨가하는 방법이 오계원시생식세포의 생존율이 높음을 확인했다. 또한 동결보호제로서는 10% DMSO 보다 10% EG를 기초배지에 첨가해서 사용하는 방법은 동결 및 융해 후의 원시생식세포의 생존율을 높일 수 있을 것이라 사료된다.

원시생식세포의 동결보존은 아직 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만 무엇보다 성공적인 동결보존은 동결보호제의 선택에 있다. 동결보호제는 EG, propylene glycol (PROH), DMSO, glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 투과성 동결보호제(permeable CPA)와 당(sugars) 또는 혈청알부민(serum albumin), 혈청(serum), polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone

(PVP), ficoll 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비 투과성 동결보호제(non-permeable CPA)로 구분된다(Lovelock 등, 1959; Boutron 등, 1984). 본 연구에서는 세포부착, 성장 등에 필요한 각종 단백질, polypeptide, 호르몬, 각종 영양소 및 무기물질, 억제인자로 구성되어 있는 세포내 비투과성 동결보호제인 FBS 및 CS를 사용하였다. Yoon 등(1997)은 마우스의 초기배자(발생 3일째)를 초자화 동결하는데 있어 본 연구와 동일한 농도인 15% FBS를 사용했는데 이는 분자량이 너무 크기 때문에 세포 내로 유입되지 못하고 동결 시 배자 혹은 PGCs 내의 수분의 탈수를 용이하게 하거나 동결 후 융해 시에 급격한 삼투압의 변화 등에 따른 세포질의 팽창을 방지했을 가능성이 생각된다. 이와 같은 비투과성 항동해제는 단지 세포 내 물질을 안정화 시켜주는 물질로 첨가되기 때문에 닭 PGCs의 초자화 동결시에는 15% FBS가 적절한 것으로 사료된다. 동결보호제로 사용되는 EG는 분자량이 비교적 작고 세포막 투과성이 다른 동결보호제에 비해 뛰어난 특성 있어 EG를 기본으로 만든 동결액은 매우 빠르게 삼투압의 평형에 도달하며 삼투압의 충격이 거의 없다는 이점이 있다. 또한 처리시간이 짧아짐으로 세포에 미치는 영향을 극소화 할 수 있다는 장점이 있다. 이런 이유로 EG는 동결보호제로 가장 널리 사용되고 있으며(Martino 등, 1996; Sommerfeld 등, 1999), 포유동물의 난자의 유리화 동결에 적당한 동결보호제로 알려져 있다(Bautista 등, 1998). 또한 EG를 이용하여 동결보존 하였을 경우 다른 보존액을 이용 했을때 보다 난자나 배아가 발생이 잘 진행되었다고 보고된 바가 있다(Chi 등, 2002; Kim 등, 2004). 이와 같은 보고들로부터 본 연구에서는 동결보호제로 EG를 이용하고, 동결 방법은 완만 동결법을 사용했지만, 앞으로 동결 처리시간을 매우 빨리 처리하는 유리화 동결방법이 PGCs에 미치는 영향을 분석하는 것 또한 중요한 연구 영역이라고 추정된다.

DMSO의 경우에는 다른 동결보호제에 비하여 여러 가지 단점에 관한 연구 결과들이 보고된 바 있다(Rezazadeh 등, 2009). 확산 속도가 느리며 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가 또는 세포 소기관 분열 및 세포분화 중 DNA methylation 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 하지만 최근 확산속도가 느린 DMSO와 EG와의 혼합된 동결보호제를 사용했을 때 동물뿐 만 아니라 인간 난자와 배아의 동결보존에서 그 효과가 뛰어나다는 보고가 있다(Desai 등, 2007; Lucena 등, 2006; Pugh 등, 2000). 실제로 DMSO는 세포 내부로 투과되면서 glass-forming으로의 특성을 더욱 촉진하며, 서로 다른 종류의 동결보호제를 만나서 상호보완적으

로 투과율을 더 높이는 결과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2010). 이전에 발표된 보고에 의하면 소 배아(bovine)를 이용해 40% EG 단독의 동결용액의 사용보다 혼합된 동결보호제 사용이 더 높은 배 발달율에 관한 보고(Pugh 등, 2000)를 살펴 볼 수 있는데 이상의 보고들로부터 차후, EG와 DMSO와의 혼합된 동결 보호제를 사용이 닭 원시생식세포의 동결 및 융해 후의 생존율에 미치는 영향에 관한 연구의 필요성을 설명하고 있다.

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 동결정액보존 기술의 경우 아직까지 높은 인공 수정률이 보고되지 않아 역시 한계점을 지닌다. 따라서 원시생식세포의 동결 및 융해 기술은 멸종위기의 희귀동물이나 경제적 가치가 큰 동물의 생식세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다. 그러므로 원시생식세포의 대량확보 수단으로서의 원시생식세포동결보존기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이며, 본 연구에서 제안하는 원시생식세포의 활용이 가장 적합하다고 할 수 있다.

요 약

귀중한 한국재래닭(오계)의 원시생식세포를 냉동보존하고, 키메라 닭을 통한 재래종의 복원을 도모하는 방법을 실용화하기 위해서, 오계의 원시생식세포에 있어 최적의 동결방법에 대해 검토했다. 원시생식세포의 동결은, 세포를 분리한 후, 동결배지의 기초가 되는 혈청으로서 소 태아혈청(FBS) 그리고 닭 혈청(CS)를 이용하고, 동결보호제로서는 EG 및 DMSO의 첨가량을 2.5, 5, 10, 15 %로 설정하고, 300 μ L의 동결배지 용량으로 동결 튜브 안에서 -70°C 로 동결했다. 융해 후에는 오계PGC의 생존율을 확인 및 검토를 했다. 그 결과, FBS 처리군이 CS 처리군 보다 생존 PGC 회수율이 높은 경향을 나타냈다. 또한 항동해제로서 최적의 조건은 10% EG + FBS의 조합을 기초로 한 동결배지에서 가장 높은 오계원시생식세포의 생존율을 확인했다. 이러한 결과들로부터 한국재래종(오계)의 원시생식세포의 동결보존의 실용화가 보다 더 향상 될 수 있는 또 하나의 방법이 될 수 있음을 시사한다.

(주제어: 원시생식세포, 동결방법, EG, 생존율, 오계)

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ008240032013)에서 연구비를 지원 받았습니다.

인 용 문 헌

Allioli, N., Thomas, J.L., Chebloune, Y., Nigon, V.M., Verdier, G. and Legras, C. 1994. Use of retroviral vectors to introduce and

- express the β -galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev. Biol.* 165:30-37.
- Blackburn, H.D. 2006. The National Animal Germplasm Program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult Sci.* 85:210-215.
- Bakst, M.R. and Sexton, T.J. 1979. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility.* 55:1-7.
- Bautista, J.A. and Kanagawa, H. 1998. 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-propandiol aqueous solutions: Comparison with equilibrium, *Cryobiology.* 21:183-191.
- Chalah, T.F., Seigneurin, E., Bleisbos and Brillard, J.P. 1999. *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo.* *Cryobiology.* 39:185-191.
- Chi, H.J., Koo, J.J., Kim, M.Y., Joo, J.Y., Chang, S.S. and Chung, K. S. 2002. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum. Reprod.* 17:2146-2151.
- D'Costa, S.D., Pardue, S.L. and Petite, J.N. 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian. Poult. Biol. Rev.* 12:151-168.
- Desai, N., Blackmon, H., Szeptycki, J. and Goldfarb, J. 2007. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: postvitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod. Biomed. Online.* 14:208-213
- Eyal-Giladi, H., Ginsburg, M. and Farbarov, A. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *Journal of Embryology and Experimental Morphology.* 65:139-147.
- Eyal-Giladi, H. and 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.
- Freshney, R.I. 2005. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th Edn Wiley-Liss Inc. Hoboken.
- Friedler, S., Giudice, L.C., Lamb, E.J. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*49:743-764.
- Fulton, J.E. and Delany, M.E. 2003. Poultry genetic resources-operation rescue needed. *Science.* 300:1667-1668.
- Gee, G.F., Bakst, M.R. and Sexton, T.J. 1985. Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane. *Journal of Wildlife Management.* 49:480-484.

- Hamburger, V. and Hamilton, HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chicken embryo. *Journal of Morphology* 8:49-92.
- Hammerstedt, RH. and Graham, JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*. 29:26-38.
- Kim, JN., Kim, MA., Park, TS., Kim, DK., Park, HJ., Ono, T., Lim, JM. and 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, JT., Lee, SH., Lee, YJ. and Jo, DI. 2004. Utility of bolus suture and silicone protector in auricular reconstruction of microtia. *J. Korean. Soc. Plast. Reconstr. Surg.* 31:9-16.
- Kim, H., Choi, JS., Yang, BS., Ko, YG., Kim, JH., Choi, SB. and Kim, SW. 2011. A comparison of reproductive ability on various korean native chicken. *Reprod. Dev. Biol.* 35:391-394.
- Kino, K., Pain, B., Leibo, SB., Cochran, M., Clark, ME. and Etches, RJ. 1997. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.* 76:753-760.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T. 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish. Physiol. Biochem.* 28:479-480.
- Lovelock, JE. and Bishop MWH. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 183:1394-1395.
- Lucena, E., Bernal, DP., Lucena, C., Rojas, A., Moran, A. and Lucena, A. 2006. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil. Steril.* 85:108-111.
- Maeda, T., Terada, T. and Tsutsumi, Y. 1984. Morphological observations on frozen and thawed muscovy spermatozoa. *Br. Poult. Sci.* 25:409-413.
- Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059-1069.
- Mozdziak, PE., Angerman-Stewart, J., Rushton, B., Pardue, SL. and Petite, JN. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84:594-600.
- Natio, T., Tajima, A., Tagami, T., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of production and Fertility*. 102:321-325.
- Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Atsumi, Y., Ito, Y., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H., Park, TS., Hong, YH. and Kwon, SC. 2003. Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ(EG) cells into recipient embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 65:389-395.
- Park, JK., Go, YE., Jin, HE., Hyung, JW., Lee, WS., Yoon, TK. and Lee, DR. 2010. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. *Korean. J. Reprod. Med.* 37(4):307-319.
- Park, TS., Hong, YH., Kwon, SC., Lim, JM. and Han, JY. 2003. Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ(EG) cells into recipient embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 389-395.
- Park, TS., Jeong, DK., Kim, JN., Song, GH., Hong, YH., Lim, JM. and 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.
- Pugh, PA., Tervit, HR. and Niemann, H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58:9-22.
- 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.
- Polge, C. 1951. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C . *Nature*. 167:949-950.
- Rezazadeh, V. M., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F. and 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.
- Shaw, DL., Carsience, RS., Etches, RJ. and Verrinder, GAM. 1992. The fate of female donor blastodermal cells in male chimeric chickens. *Biochem. Cell. Biol.* 70:1218-1229.
- Sommerfeld, V. and Niemann, H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38:95-105.
- Swift, CH. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *American Journal of Anatomy*. 135:51-70.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and 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. and 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. and 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. and 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.
- Watanabe, M., Kinutani, M., Naito, M., Ochi, O. and Takashima, Y. 1992. Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development*. 114(2):331-338.
- Yasuda, Y., Tajima, A., Fujimoto, T. and Kuwana, T. 1992. A method to obtain germ-line chimeras using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fertil.* 96:521-528.
- Yoon, SY., Sohn, C. and Bae, IH. 1997. Cryopreservation of Day 3 Mouse Embryos by Vitrification. *Kor Fertil.* 24:325-333.
- Zhao, DF. and Kuwana, T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci.* 44:30-35.
- (Received Jun. 17, 2013; Revised Aug. 12, 2013; Accepted Sep. 13, 2013)