

Polyampholyte가 소난관상피세포의 초자화 동결방법에 미치는 영향

김성우*, 이재영, 김찬란, 유연희, 이성수, 고응규
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

The Effects of Polyampholyte on Vitrification Process for cryopreservation of Bovine Oviduct Epithelial Cell

Sung Woo Kim*, Jae-Yeong Lee, Chan-Lan Kim, Yeonhee Yu,
Sung Soo Lee, Yeoung-Gyu Ko

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

요약 본 연구의 목적은 가축의 조직에서 유래한 동물세포를 재생산하기 위하여 세포를 동결하는 방법으로 초자화 동결법을 간단하게 이용하는 조건을 확립하고자 하였다. 소난관상피세포를 초자화 동결법에 적용하기 위하여 소 난관상피세포를 0.25ml 스트로에 밀봉하여 액체질소에 직접 노출하였다. 발정 3.5일자의 난관에서 추출된 소 난관상피세포는 polyampholyte가 주성분인 StemCell Keep™을 구매하여 초자화 동결을 유도하였고 5, 10, 25, 50, 75 및 100% 농도에서 생존율을 조사하였다. 세포의 생존성은 트립판 블루염색기법과 SYTO-13/PI 핵 염색시약을 이용하여 차별적 생사염색기법을 이용하여 분석하였다. Trypan blue 염색법에서는 각각 5.6±11.8, 12.5±7.2, 53.0±2.7, 85.1±6.9, 79.8±0.6 및 60.7±6.7%의 생존율이 관찰되었고, SYTO-13/PI 염색시약에서는 각각 4.6±2.5, 30.8±12.1, 58.4±2.5, 85.5±1.2, 79.8±0.6 및 71.2±1.2%의 생존율이 관찰되었다. 이러한 결과는 소 난관상피세포는 50% StemCell Keep™ 농도의 동결배양액을 이용하여 동결 보존하는 것이 가장 우수한 생존율을 얻을 수 있었고 세포 유전 자원 은행을 위한 영구보존에 적절할 것으로 판단된다.

Abstract The purpose of this study was to establish a simple vitrification protocols to preserve animal cell lines derived from tissues of livestock that could be recultured. Bovine oviduct epithelial cells (BOEC) were used for the vitrification process using a 0.25 ml straw to increase cryopreservation efficiency. BOEC was cultured from the oviduct of 3.5-day estrus state, and the commercially available polyampholyte StemCell Keep™ was used as a cryoprotective agent. Using different concentrations, the viability rates of BOEC in 5, 10, 25, 50, 75, and 100% in freezing media were investigated. Survivability was determined using a differential staining technique using a trypan blue test and a CYTO-13/PI staining protocol. The viability rates of BOEC in the trypan blue test were 5.6±11.8, 12.5±7.2, 53.0±2.7, 85.1±6.9, 79.8±0.6, and 60.7±6.7% with a respective concentration of StemCell Keep™. The viability rates in CYTO-13/PI staining were 4.6±2.5, 30.8±12.1, 58.4±2.5, 85.5±1.2, 79.8±0.6, and 71.2±1.2%, respectively. These results indicate that BOEC could be preserved with StemCell Keep™ without toxicity in a 0.25-ml straw. The optimal concentration of vitrification solution with StemCell Keep™ was determined to be 50% and can be considered as a proper preservation method for cryobanking.

Keywords : Polyampholyte, Bovine Oviduct Epithelial Cell, Animal Genetic Resources, Freezing, Vitrification

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ10488102)의 지원으로 수행되었음.

*Corresponding Author : Sung Woo Kim(Rural Development Administration)

email: sungwoo@korea.kr

Received April 22, 2020

Revised May 26, 2020

Accepted June 5, 2020

Published June 30, 2020

1. 서론

동결유전자원으로서 세포를 동결 보존하는 기술은 정자, 수정란 및 난자를 동결하는 것과 마찬가지로 주요 국가유전자원을 생산하는 주요 방법 중 하나라고 알려져 있다[1]. 정자나 수정란과 같은 동결유전자원과 다르게 세포 유전자원은 필요에 따라 실험실에서 용해하여 적절한 방법으로 배양하게 되면 세포수를 크게 증식시킬 수 있다. 이를 다시 동결하면 유전자원의 재생산이 가능하며 용해된 세포는 생명공학기술에 의하여 여러 가지 방법으로 활용될 수 있고 핵이식을 이용한 수정란 이식기술은 멸실된 개체를 복원하는 방법으로 그 가치가 높다[2-4]. 동결 보존된 세포는 비교적 간단한 방법으로 DNA를 제공할 수 있어 종축의 우수한 형질을 분석하는데 활용될 수 있어 미래 연구자원으로 활용될 수 있다[4].

세포를 영구보존하기 위하여 동결 보존하는 것은 거의 모든 세포관련 실험실에서 실시되고 있으나, 세포의 용해 후 생존율과 분화능력은 실험자 및 실험실 마다 결과가 상이한 경우가 대부분이다[5]. 특히 건강한 생체조직에서 유래한 1차 배양 세포(primary cultured cell line)는 암세포(cancer cell line)와 달리 동결보존에 충격에 민감한 경우가 대부분이다[6, 7]. 세포 동결 연구영역에서 특히 줄기 세포(stem cell line)는 미분화된 상태를 유지하는 것이 매우 중요하다. 이 때 동결보호제와 보존온도는 줄기 세포의 분화능력을 저하시키는 문제점이 최근 보고되고 있어 세포 동결은 중요한 연구영역으로 판단된다[8, 12].

세포를 동결하는 가장 일반적인 방법은 세포배양법으로 증폭된 세포를 효소를 이용하여 단일세포화 시키고, 동결보호제가 포함된 배양액으로 적절한 농도로 부유하여 초저온냉동고에서 세포를 0.3-1°C/min의 냉각속도로 동결하는 방법이다[5, 9]. 이러한 방법을 완만동결법(slow freezing protocol, SFP)이라고 부르며 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 초저온냉동고의 냉각속도는 냉동고의 크기와 위치에 따라 상이하므로 동결속도를 균일하게 유지하기가 힘들며 동일한 실험방법을 이용하더라도 생존율에 대한 변이가 커서 세포주를 다시 녹이고 다른 실험을 준비하는 과정에서 균일성을 유지하기가 힘든 점이 존재한다.

세포주의 생존성이 우수한 동결기술을 개발하는 것은 실험시간을 단축할 수 있으며 고가의 배양액을 절약할 수 있어 경제적 가치가 높다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 동결보호제를 활용하지 않고 액체질소에 직접 세포를 노출하여 동결하는 유리화 동결기술(vitrification freezing protocol, VFP)이 최근 개발되었으며 줄기세

포의 동결보존에 활용되고 있다[9-12].

VFP는 고농도의 동결보호제를 이용하거나 점성이 높고 분자구조상 얼음결정형성이 쉽게 되지 않는 물질을 이용한다[9]. VFP는 높은 삼투압을 이용하여 세포 내부의 물 성분을 제거하고 동결보호제로 치환하는 과정과 급격한 온도 변화를 유도하여 세포 내 외부의 얼음결정이 정형화되지 않은 상태를 유지하는 과정으로 나누어 볼 수 있다. 세포내부의 동결과정 중 형성되는 얼음 결정(ice crystal, IC)은 부피를 증가시키고 날카로운 형태로 세포막을 파괴하여 세포의 생존성을 낮추는 기능을 수행한다[9, 13, 15, 16]. IC는 여러 가지 동결보호제와 주변 환경에 따라 다양한 크기로 형성된다고 알려져 있어 다양한 방법을 적용하여 동결 보존을 실시한다[9, 14, 15]. VFP에 이용되는 다른 방법은 IC형성을 방해하는 단백질(antifreezing protein or peptide, AFP)을 첨가하여 비 정형 얼음결정을 유도하는 방법이 최근 보고되었다[14-16]. 이에 반하여 SFP는 냉각속도를 최대한 낮추어 미세한 얼음결정이 형성되도록 유도한다. 주로 포유류 수정란 동결에 많이 사용되었으며 수정란 이식의 간편화를 위하여 낮은 농도의 glycerol과 ethylene glycol을 이용하기도 한다.

AFP는 극한 지역에서 적응한 생물에서 발견되는 물질로 미생물, 곤충 및 식물에서 발견되고 있다. 생물의 진화 과정에서 자연적으로 동결을 방지하여 생존성을 높이는 물질로 진화된 AFP는 최근 동결보존액의 원료 물질로 주목받고 있다. 이러한 물질은 SFP나 VFP에 모두 적용이 가능한 것으로 알려져 있으나 생물에 대한 독성이 존재하는 문제점이 있다[17-19]. AFP 특징을 가진 합성폴리머분자는 이러한 독성이 낮은 것으로 알려져 왔는데, 항동결 분자 중 하나인 polyampholytes는 ϵ -poly-L-lysine 유도체(PPLs)는 세포의 초저화 동결에 이용되었다[20-21]. 이러한 PPLs는 StemCell Keep™ (SCK, Abnova, Taiwan)라는 상호로 판매되고 있으며 단일 합성물질로 동물유래 바이러스에 대한 오염이 없는 장점이 있다. PPLs의 형태는 AFP와 유사하여 IC형성을 억제하여 세포막의 손상을 방지하는 것으로 알려졌다[21].

본 연구는 소난관상피세포(bovine oviduct epithelial cell, BOEC)를 3.5일자의 발정기 암소의 난관에서 추출하여 2~3주간 배양하였다. 세포 동결보존의 효율성을 높이기 위하여 VFP를 적용하였다. 이 때 사용되는 동결보호제는 PPLs를 주성분으로 시판되고 있는 SCK을 구입하여 이용하였다. BOEC의 동결보존 최적화를 위하여 배양액을 이용하여 다양한 농도에서 VFP를 실시하였고 용해된 세포의 생존성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 BOEC의 추출 및 배양

한우 발정기 3.5일째의 난관을 도축장에서 확보하고 6시간 이내에 실험실로 이송하였다. 멸균 거즈를 항생제 (penicillin, streptomycin)가 첨가된 calcium and magnesium free phosphate buffered saline(PBS)에 적셔 분리된 난관조직을 싸고 보온병에서 32~35℃를 유지하였다. 멸균실험대에서 난관을 외과용 수술칼로 약 3-4mm의 크기로 세절하였고, 20% FBS가 함유된 세포 배양 플라스크에서 10-15일 동안 배양하였다. 배양기는 온도를 38.5℃로 맞추었으며 조직이 배양접시에 정착하도록 유지하였으며 3~4일마다 배양액을 절반가량 교체하여 조직에서 떨어져 나온 세포가 바닥에서 증식하도록 유도하였다. 0.05% 트립신을 이용하여 트립신에 먼저 반응하는 섬유아세포를 제거하였고, BOEC를 회수하기 위하여 내막세포 고유의 형태를 가진 세포주 콜로니를 0.5% 트립신과 Scraper를 이용하여 회수하여 계대 배양하였다. 80~95%의 세포밀도(confluency)가 될 때, 계대를 실시하여 세포를 증식하였고 계대회수가 약 4~10의 세포를 이용하여 세포 동결에 공시하였다.

2.2 동결배양액의 제조

20% FBS(Gibco, USA)가 함유된 DMEM/F12 배양액(Gibco, USA)을 기본배양액으로 동결배양액을 제조하였다. SCK가 5, 10, 25, 50, 75 및 100%가 함유되도록 첨가하여 BOEC를 초자화 동결하였고 모든 처리는 3반복 수행하여 생존성 분석에 사용되었다.

2.3 BOEC세포의 동결

80~90%의 밀도로 배양된 세포를 0.25% 트립신을 2~3분간 37℃에서 처리하여 75cm² 세포배양 플라스크 바닥에 붙어 있는 BOEC를 구형화하여 회수하였다. 15ml 원심분리관에서 약 5~10번의 피펫팅을 통하여 단일구형 세포를 형성시켰고 0.3% FBS가 함유된 PBS를 첨가하여 트립신의 활성을 제거하였다. 부유된 세포를 300G 원심 분리 값으로 10분간 처리한 후, 상층액을 제거하였다. 실험용 얼음에 옮겨 세포피를 3~5분간 노출시켰으며 미리 실험용 얼음에 노출된 동결배양액을 첨가하여 천천히 피펫팅을 10회 실시하였다. 분산된 형태의 세포 부유물을 0.25ml 스트로에 봉입하였고 얼음 위 알루미늄 호일에 정지하여 5분간 안정화를 실시하였다. 봉입 시 2~3mm

크기의 공기가 1~2개 포함되도록 조절하였으며 초음파 스트로실링장치(Ultra seal 21, Minitube, Germany)로 밀봉하였다. 냉각된 세포는 액체질소(liquid nitrogen, LN₂)에 바로 침지하여 초자화 동결을 실시하였다.

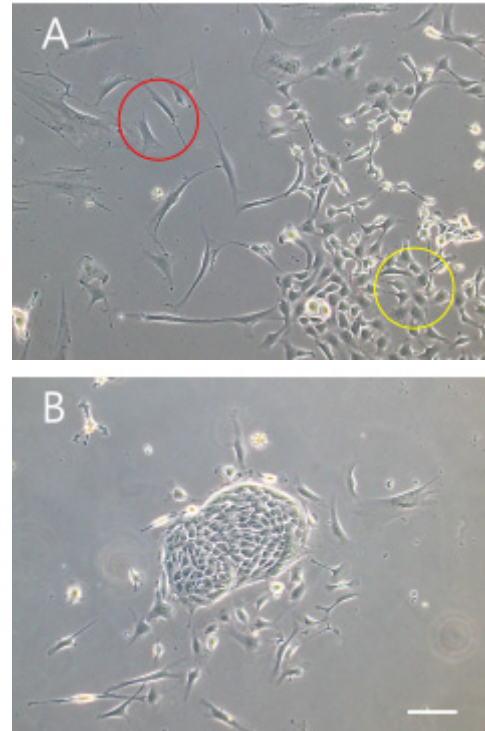


Fig. 1. The image of bovine oviduct originated cells
A : Bovine fibroblast cell (red circle) and BOEC (yellow circle). B : BOEC colony. The measuring white bar is 100 μ m

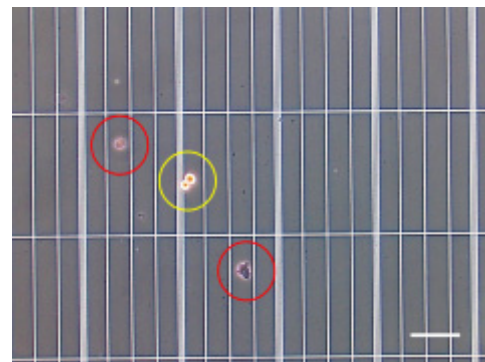


Fig. 2. Trypan blue test of BOECs
The red circles designated TB positive cells and the yellow circle shows survived TB negative cells. The measuring white bar is 100 μ m.

2.4 동결 BOEC의 용해

정액 보존용 알루미늄 케인에 보존된 0.25ml 스트로는 20~25℃ 공기 중에서 5초, 37℃에서 20초간 용해하였으며 1ml 1회용 주사기를 이용하여 37℃로 미리 가온된 희석액 2~3ml에 직접 주입하였다. 동일한 원심분리력으로 희석된 동결보존액을 제거하고 기본배양액을 첨가하여 배양을 실시하였다.

2.5 용해된 BOEC세포의 생존율 조사

용해된 세포의 생존성을 검증하기 위하여 2가지 방법으로 검사하였다. 가장 흔히 이용되고 있는 4%의 trypan blue (TB) 용액을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 세포부유액과 TB를 1:1희석하여 2-3분간 반응시키고 죽은 세포를 염색하였다. 세포계수기 (cell counting chamber)와 현미경 10배 대물렌즈를 이용하여 생사 염색을 판정하였다. TB에 의한 BOEC의 염색도는 Fig. 2와 같이 관찰되었으며 붉은색으로 표지된 영역은 TB 양성(+)으로 동결과정에서 막손상이 일어나 TB가 세포질로 침투하여 짙은 파랑으로 염색되었으나 노란색 원으로

표지된 영역의 세포는 막손상이 없어 둥근 형태의 세포를 유지하고 있으며 염색이 되지 않고 세포막 주위가 흰색으로 빛에 의하여 반사된 형태를 보여주고 있다.

형광염색을 위하여 PBS에 propidium iodide (PI, Molecular Probes, USA) 0.5 μM과 SYTO-13 (Molecular Probes, USA) 1 μM 농도가 되도록 첨가하여 부유된 세포와 1:1로 희석하여 배양기에서 25분간 배양한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 세포막손상에 의하여 사멸된 세포는 PI에 의하여 붉게 관찰되었으며 살아 있는 세포는 SYTO-13에 의하여 녹색으로 관찰되었다. 배양접시 위에 염색된 세포 부유물로 10~20μl 소적을 만들어 5분간 배양기에서 정치한 후 형광현미경(Olympus IX-71, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. SYTO-13으로 염색된 세포는 녹색형광필터(Ex 469-495, Em 510IF)로 관찰하였으며 PI는 적색형광필터(Ex 530-550, Em 575IF)로 관찰하면서 사진을 촬영하였다. 디지털사진기(DP20 Olympus, Japan)로 얻은 이미지는 Image J 프로그램을 이용하여 세포수를 분석하였고 Fig. 3에서 보는 바와 같이 유리화 동결 후 BOEC세포를 SYTO-13과 PI용액으로 염색하면 각각 녹색과 붉은색의 형광으로 표지되었다.

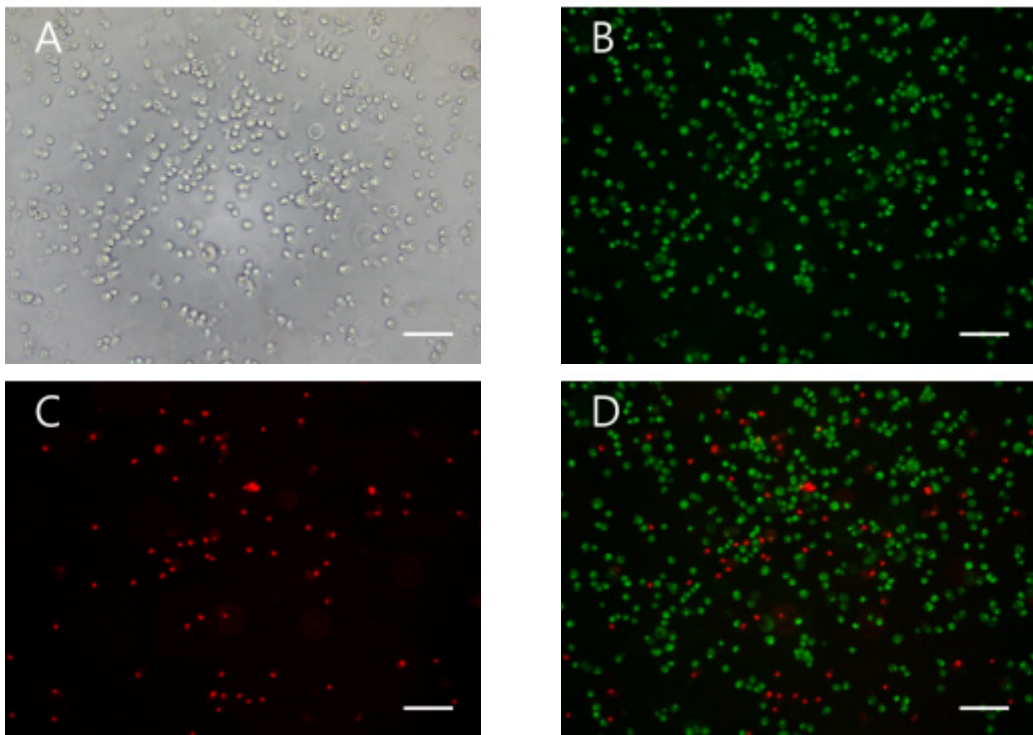


Fig. 3. Analysis of Live/Dead staining with SYTO-13 and PI in vitrified/thawed BOEC.

A. The transmission image, B. SYTO-13 accumulated cell with green color. C. PI stained dead cells. D. Merged Image. PI (propidium iodine)

2.6 통계 분석

용해된 세포의 생존율을 One-way ANOVA test를 실시하여 분석하였으며 분석된 자료의 평균간 유의성은 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)로 분석을 실시하였다.

3. 실험결과

3.1 Trypsin 처리에 의한 BOEC의 분리

도축장에서 얻은 생식기에서 난관을 오염을 방지하면서 멸균가위로 조직에서 분리하였다. 배양 4~5일째, 배양된 세절 난관은 세포배양 플라스크 바닥에 점착되어 상피세포와 일부 섬유아세포가 동시에 자라는 경향을 관찰할 수 있었다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 난관유래 세포주는 2가지 형태의 세포로 관찰되었다. 붉은 원으로 표시된 영역은 전형적인 섬유아세포의 형태를 보여주고 있으며 노란색원으로 표시된 영역은 BOEC로 판단되었고 도톰한 형태의 세포로 관찰되었다. Fig. 1B에서 관찰된 BOEC세포는 콜로니를 형성하고 있었으며 배양 5일째에 세포사이의 공간이 촘촘한 형태의 밀집된 콜로니를 형성하였다.

Table 1. The effects of StemCell Keep™ concentration on the viability of frozen/thawed BOEC.

% of SCK	% of cell viability	
	TB	SYTO13/PI
5	5.6±9.6	4.6±2.5 ^a
10	15.3±5.5	30.8±12.1 ^b
25	53.0±2.1 ^a	58.4±2.5 ^{ca}
50	93.5±2.0 ^b	95.9±2.9 ^d
75	76.7±6.5 ^c	79.8±0.6 ^e
100	63.0±4.1 ^d	71.2±1.2 ^{fa}

Means with capital letters of superscripts were significantly different between groups ($p < 0.05$).

Means with small letters of superscripts were significantly different within groups ($p < 0.05$).

Data are expressed as the mean±SD for three independent experiments. TB is trypan blue and PI is propidium iodine. StemCell Keep™ is trademark of polyampholytes agent from Abnova company.

3.2 SCK농도가 BOEC 생존율에 미치는 영향

동결된 세포는 약 3일에서 2주간 액체질소탱크에 보존되었으며 용해 후 원심분리방법으로 동결보호제가 제거된 세포는 trypan blue 염색법과 SYTO-13염색법으

로 생사를 판단하였다. 5, 10, 25, 50, 75 및 100%의 SCK가 함유된 동결배양액에서 각각 초자화 동결을 실시하였으며 용해된 세포의 생존율을 조사하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 TB 염색법에서는 5, 10, 25, 50, 75 및 100% 처리군에서 생존율이 각각 5.6±9.6, 15.3±5.5, 53.0±2.1, 93.5±2.0, 76.7±6.5 및 63.0±4.1%로 관찰되었다. 5%와 10% SCK처리는 유의성이 없는 것으로 판단되었으나, 25, 50, 75 및 100%의 처리는 유의성이 있는 것으로 판단되었다. SYTO-13/PI염색시약을 이용한 생존율 판단은 각각 4.6±2.5, 30.8±12.1, 58.4±2.5, 95.9±2.9, 79.8±0.6 및 71.2±1.2%의 생존율이 관찰되었다. SCK처리 농도에 따라 모든 처리 군에서 유의성이 있는 것으로 판단되었다. TB분석법과 SYTO-13/PI 분석법에 따라 25%와 100% SCK 처리군에서 유의적 차이가 있었으며 다른 농도에서는 분석방법에 따른 유의적 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

4. 고찰

세포 동결기술은 실험실에서 가장 먼저 습득하는 기술로서 많은 연구자가 활용하고 있으며 손쉽게 세포를 다시 증식시켜 이용할 수 있다. 그러나 동결 후 생존한 세포가 적더라도 비교적 쉽게 증식되므로 생존 효율에 대한 관심이 낮은 편이다. 그럼에도 불구하고 조직에서 추출된 신선한 세포는 동결이 어려우며 이러한 세포중 primary cell과 줄기세포는 기능적인 특성을 유지하면서 동결 보존하여야 한다. 특히, 단백질질을 분비하는 포유류 세포의 경우, 세포 주를 유지하고 관리하는 것은 매우 중요한 문제라고 판단된다.

포유류의 난관은 정자의 수정능획득과 난자의 수정 및 초기 할구의 발생에 적절한 환경을 제공하는 것으로 알려져 있다 [23]. 여기에서 BOEC는 중요한 기능을 담당하는 세포로서 정자와 난자와 직접 접촉하는 세포로 알려져 있다. 특히, 종 특이적 수정란 발생에 중요한 당단백질을 분비하는 것으로 알려져 있고, 수정란 체외 발생에 많이 이용되는 세포로서 산업적 이용성이 높다. 또한, 호르몬에 반응하여 세포 분화가 일어나는 세포로 분화 및 역 분화에 대한 연구자료로 이용성이 높으므로 세포 유전자원의 동결 보존 연구에 적합한 세포라고 판단된다.

세포 동결보존을 위하여 초창기에 사용된 동결보호제는 glycerol로 Polge에 의하여 1949년 소 정자 동결 연구에서 처음 보고되었다[24]. 그 후 Lovelock 등[25]에

의하여 1959년 DMSO의 이용성이 소개되었고, DMSO는 시약 값이 저렴하고 glycerol보다 세포 침투속도가 빨라 현재까지 많이 이용되고 있다. 그러나 glycerol과 마찬가지로 침투성 동결보호제가 가진 문제점이 존재하며 이는 세포의 분화에 영향을 끼치는 것으로 보고되었다[26, 27]. 침투형 동결보호제로서 DMSO는 유리화동결을 실시하기 위하여 10%보다 높은 농도로 동결배양액을 만들어 세포에 처리할 때 독성이 높아지는 문제점이 있고 초저온냉동고에서 완만동결을 유도할 경우에도 2시간 이상의 냉각 과정에서 세포의 독성이 나타난다. 초저온 동결은 이러한 문제점을 회피하기 위하여 액체질소에 바로 침지하거나 정자와 같이 액체질소 위 약 5cm 위에서 10분간 노출하여 유리화 동결을 유도하기도 한다. 또한, AFP는 VFP에 도움이 되는 물질로서 물과 결합하는 성격이 강한 아미노산의 중합체로 이루어진 AFP는 새로운 물질로서 유리화 동결에 소개되었으며 주로 곤충과 극지방의 어류와 일부 식물에서 한랭한 환경에 적응하기 위하여 진화된 물질로 알려져 있다[17-19]. 본 연구에서 사용된 SCK는 일본 교토대 현승휴 교수가 개발한 물질로 poly-L-Lysine과 succinic anhydride의 중합으로 합성되었다[20]. 이 물질은 AFP와 유사한 특성을 가지고 있음이 보고되었고 다양한 세포의 동결 보존에 이용될 수 있음이 밝혀졌다[20-22]. SCK는 PPLs를 주성분으로 줄기세포의 동결배양용으로 판매되었으나, 판매회사의 동결법에 따라 100%의 용액으로 VFP를 적용할 때 BOEC의 생존율은 약 70% 내외의 생존율이 관찰되었다. SCK는 단백질이 필요 없는 동결보존액으로 추천되었으나, 본 연구에 따르면 BOEC 동결 최적화를 위하여 약 10% FBS가 최종 농도로 필요하다는 것을 알 수 있으며 용해 후 생존성이 95.9%로 최적화 할 수 있었다. 그러므로 세포특성에 따라, SCK의 농도를 조절할 필요성이 있고 필요에 따라 FBS가 함유된 배양액을 첨가하는 것이 유리하다고 판단된다.

본 연구에서 동결 보존된 세포의 용해 후 생존율을 조사하는 방법으로 TB와 SYTO-13/PI염색법을 모두 이용하여 BOEC의 용해 후 생존율을 조사하였다. BOEC의 생존율에서 TB와 SYTO-13/PI 분석법에 의한 자료는 통계적 차이가 존재하였다. 그럼에도 불구하고 모두 50% SCK 농도에서 가장 우수한 생존성을 관찰 할 수 있었는데, 이는 TB분석법의 특성상 세포계수기를 이용하고 비교적 적은 수의 세포 분석량에 의한 차이라고 판단된다. 즉, 많은 연구자들은 육안으로 계수하는 방법에 의하여 세포계수기 자체의 오차가 심하다고 보고하고 있으며 낮

은 농도에서 오차범위가 큰 것은 이에 따른 결과라고 판단된다. 본 연구에서는 수정란 동결에 이용되는 0.25 ml 스트로를 이용하여 BOEC를 봉입한 후 액체질소에 바로 침지를 실시하였는데 이는 일반 세포 동결용기(cryovial)보다 더 우수한 성적을 얻은 원인으로 간주되었다. 0.25 ml 스트로는 동일한 부피공간에서 동결용기보다 더 많은 세포를 보존할 수 있다는 장점이 존재한다. 보통, 1.8 ml 세포동결보존용기는 5개 정도 1개의 케인에 보존할 수 있으나, 0.25 ml 스트로는 동일한 크기의 케인에서 약 20 개 스트로를 보존할 수 있으므로 대형 액체질소용기 내부의 부피를 줄일 수 있다. 이는 실험실에서 액체질소 탱크를 유지 관리하고 세포유전자원을 영구보존하는 방법으로 매우 중요한 장점이라고 판단된다. 또한 0.25 ml 스트로를 사용 할 때, 적절한 크기의 내부 공기방울이 없을 경우 팽창되는 얼음 결정에 의하여 파손되는 경우가 있으므로 주의가 요구된다. 전통적인 세포 동결 방법으로 SFP를 활용하면, 회복되는 세포는 약 10~30% 내외로 보고되고 있으며 민감한 세포의 경우 5~10%로 보고되고 있다. VFP에서 고농도의 DMSO와 ethylene glycol의 혼합동결보호제를 이용하여 세포를 동결하는 경우, 약 75% 생존율이 보고되고 있다. 본 연구의 VFP에서 BOEC의 생존율이 95%이상을 보여주는 것은 우수한 성적이며 이는 다른 연구자의 PPLs를 이용한 VFP 성적과 동일한 수준으로 관찰되었다.

본 연구에서는 동결된 세포의 생존율을 분석하기 위하여 SYTO-13/PI염색기법을 사용하였다. 이 분석법은 육안으로 생사를 판단하는 TB분석법보다 더 많은 세포를 빠르게 분석할 수 있어 정확도가 더 높다고 판단된다. 특히 SYTO-13은 배양시간에 따라 세포 내 농도가 높아지는 특성이 있으므로 살아 있는 세포의 DNA와 일부 세포질의 RNA도 염색되는 것으로 알려져 있다[28, 29]. 또한 SYTO-13은 DNA에 대한 결합력이 PI보다 떨어지므로 세포손상이 일어나게 되면, 쉽게 탈염할 수 있으며 DNA와 결합력이 강한 PI에 의하여 색상이 전변되는 것으로 관찰되었다. 그러므로 TB염색보다 세포동결이나 다른 세포독성실험에 대한 반응도를 조사하는데 정확한 자료를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

5. 결론

본 실험을 종합해 보면, BOEC를 동결하는 방법에 있어서 PPLs는 이용성이 큰 것으로 판단된다. 또한 세포

동결에 필요한 최적의 조건을 제시함으로써 다른 세포 동결의 효율성 증진에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 세포의 생사염색기법으로 SYTO-13과 PI의 차별적 염색은 생존을 분석에 효율성이 높을 것으로 판단되며 국가유전자원으로 영구 보존되는 세포에 대한 가치평가에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

- [1] A. K. Belew, K. Tesfaye, G. Belay, "The state of conservation of animal genetic resources in developing countries: a review", *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.*, Vol.5, No.1, pp.58-66, Jun 2016.
DOI: <https://doi.org/10.18178/ijpms.5.1.58-66>
- [2] Y. Hoshino, K. Saeki, "Animal cloning by nuclear transfer using somatic cells recovered from organs frozen without cryoprotectant", *J. Mamm. Ova Res.*, Vol.27, No.3, pp.93-100, September 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1274/ijmor.27.93>
- [3] D. N. Wells, "The integration of cloning by nuclear transfer in the conservation of animal genetic resources", *F. Farm Animal. Genet. Resours.*, Vol.30, No.3, pp.223-241, February 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0263967X0004204X>
- [4] K. H. Campbell, "A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine", *J. Anat.*, Vol.200, No.3, pp.267-275, March 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00035.x>
- [5] K. Bowey-Dellinger, L. Dixon, K. Ackerman, C. Vigueira, Y. K. Suh, T. Lyda, K. Sapp, M. Grider, D. Crater, T. Russell, M. Elias, V. Mc. Coffield, V. A. Segarra, "Introducing mammalian cell culture and cell viability techniques in the undergraduate biology laboratory", *J. Microbiol. Biol. Educ.*, Vol.18, No.2, pp.1-7, August 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jimbe.v18i2.1264>
- [6] J. G. Baust, D. Gao, J. M. Baust, "Cryopreservation An emerging paradigm change", *Organogenesis*, Vol.5, No.3, pp.90-96, September 2009.
DOI: <https://doi.org/10.4161/org.5.3.10021>
- [7] N. Kotobuki, M. Hirose, H. Machida, Y. Katou, K. Muraki, Y. Takakura, H. Ohgushi, "Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells", *Tissue Eng.*, Vol.11, No.5-6, pp.663-673, May-Jun 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.663>
- [8] J-E. Oh, K. Karlmark Raja, J-H. Shin, A. Pollak, M. Hengstschlager, G. Lubec, "Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line.", *Amino Acids*, Vol.31, No.3, pp.289-298, October 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0256-z>
- [9] C. J. Hunt. "Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling.", *Methods Mol. Biol.*, Vol.1590, No.3, pp.41-77, March 2017.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_5
- [10] G. M. Fahy, D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H. T. Meryman, "Vitrification as an approach to cryopreservation." *Cryobiology*, Vol.21, No.4, pp.407-426, August 1984.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90079-8)
- [11] K. R. Fowke, J. Behnke, C. Hanson, K. Shea, L.M. C. Cosentino, "Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells." *J. Immunol. Methods.*, Vol.244, No.1-2, pp.136-144, October 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00263-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00263-5)
- [12] J. Yang, N. Diaz, J. Adelsberger, X. Zhou, R. Stevens, A. Rupert, J. A. Metcalf, M. Baseler, C. Barbon, T. Imamichi, R. Lempicki, L. M. Cosentino, "The effects of storage temperature on PBMC gene expression", *BMC Immunol.*, Vol.17, No.6, March 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0144-1>
- [13] N. Taghizabet, M. A. Khalili, F. Anbari, A. Agha-Rahimi, S. A. Nottola, G. Macchiarelli, M. G. Palmerini, "Human cumulus cell sensitivity to vitrification, an ultrastructural study", *Zygote*, Vol.26, No.3, pp.224-231, Jun 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199418000138>
- [14] T. H. Jang, S. C. Park, J. H. Yang, J. Y. Kim, J. H. Seok, U. S. Park, C. W. Choi, S. R. Lee, J. Han, "Cryopreservation and its clinical applications", *Integr. Med. Res.*, Vol.6, No.1, pp.12-18, March 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- [15] P. Mazur, "Cryobiology: The freezing of biological systems", *Science*, Vol.168, No.3934, pp.939-949, May 1970.
DOI: <https://www.jstor.org/stable/1729310>
- [16] D. Gao, J. K. Critser, "Mechanisms of cryoinjury in living cells", *ILAR J.*, Vol.41, No.4, pp.187-196, October 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- [17] H. J. Kim, J. H. Lee, Y. B. Hur, C. W. Lee, S-H. Park, B-W. Koo. "Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential Cryoprotectant", *Mar. Drugs*, Vol.15, No.2, Article 27, February 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3390/md15020027>
- [18] R. Gupta, R. Deswal, "Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions", *J. Boisci.*, Vol.39, No.5, pp.931-944, December 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9468-2>
- [19] R. Suris-Valls, I. K. Voets, "Peptidic antifreeze materials: prospects and challenges", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.20, No.20, Article 5149, October 2019.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20205149>

[20] K. Matsumura, J. Y. Bae, S. H. Hyon, "Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation", *Cell Transplantation*, Vol.19, No.6, pp.691-699, Jun 2010.
DOI: <https://doi.org/10.3727/096368910X508780>

[21] K. Matsumura, K. Kawamoto, M. Takeuchi, S. Yoshimura, D. Tanaka, S. H. Hyon, "Cryopreservation of a two-dimensional monolayer using a slow vitrification method with polyampholyte to inhibit ice crystal formation", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, Vol.2, No.6, pp.1023-1029, April 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00150>

[22] R. C. Deller, M. Vatish, D. A. Mitchell, M. I. Gibson, "Glycerol-free cryopreservation of red blood cells enabled by ice-recrystallization-inhibiting polymers", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, Vol.1, No.9, pp.789-794, April 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00162>

[23] B. D. Bavister, "Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro", *Theriogenology*, Vol.29, No.1, pp.143-154, January 1988.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90037-4)

[24] C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes, "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures." *Nature*, Vol.164, pp.666, October 1949.
DOI: <https://doi.org/10.1038/164666a0>

[25] J. E. Lovelock, M. W. H. Bishop, "Prevention of freezing effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential damage to living cells by dimethyl sulphoxide." *Nature*, Vol.183, pp.1394-1395, May 1959. DOI: <https://doi.org/10.1038/1831394a0>

[26] G. S. Jiang, K. H. Bi, T. H. Tang, J. W. Wang, Y. K. Zhang, W. Zhang, H. Q. Ren, H. Q. Bai, Y. S. Wang, "Down-regulation of TRRAP-dependent hTERT and TRRAP-induced CAD activation by Myc/Max contributes to the differentiation of HL60 cells after exposure to DMSO." *Int. Immunopharmacol.*, Vol.6, No.7, pp.1204-1213, August 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.02.014>

[27] B. R. Chakravarthy, R. Tremblay, P. Macdonald, V. Krsmanovic, J. F. Whitfield, J. P. Durkin, "The activation of inactive membrane-associated protein kinase C is associated with DMSO-induced erythroleukemia cell differentiation." *Biochim. Biophys Acta*, Vol.1136, No.1, pp.83-90, October 1991.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(92\)90088-S](https://doi.org/10.1016/0167-4889(92)90088-S)

[28] M. Ankarcona, J. M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhihotovsky, S. Orrenius, S. A. Lipton, P. Nicotera, "Glutamate-induced neuronal death: A Succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." *Neuron*, Vol.15, No.4, pp.961-973, October 1995.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90186-8)

[29] S. W. Kim, N. Sharma, I-S. Hwang, C. Choe, D. Kim, H-H Seong, D. K. Jeong, "Application of saponin on differential staining examination in animal

blastocysts", *Ind. J. Anim. Sci.*, Vol.87, No.9, pp.1081-1086, September 2017.
<http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJAnS/article/view/74292>

김성우(Sung Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 8월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2002년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학박사)
- 1998년 1월 ~ 2002년 6월 : 한국기초과학연구소 연구원
- 2002년 6월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 생명공학, 동결학

이재영(Jae Yeong Lee)

[정회원]



- 2014년 2월 : 명지전문대학 기계과 (전문학사)
- 2017년 2월 : 건국대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2019년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 동물면역학, 생명공학

김찬란(Chan-Lan Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의과대학 수의학과 (수의학학사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 수의학과 (수의학박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 10월 : 농림축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>

수의학, 예방의학, 친환경경

유 연 희(Yeonhee Yu)

[정회원]



- 1992년 2월 : 우석대학교 신문방송학과 (학사)
- 2013년 5월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구원

<관심분야>

체외수정란생산, 정자동결

이 성 수(Sung Soo Lee)

[정회원]



- 1998년 2월 : 제주대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2010년 8월 : 제주대학교 동물자원학과 (농학박사)
- 1993년 8월 ~ 2012년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사
- 2012년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구관

<관심분야>

가축육종학, 동물유전학

고 응 규(Gyu Yeoung Ko)

[정회원]



- 1997년 8월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2004년 3월 : 동경대학교 수의학과 (수의학박사)
- 1994년 7월 ~ 2015년 7월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구관

<관심분야>

가축번식학, 세포생화학, 생명공학