

상업용 동결보호제를 이용한 한국재래닭(오계) 원시생식세포의 동결 보존

김 현¹ · 김동훈¹ · 한재용² · 도윤정¹ · 김재환¹ · 김영신¹ · 성환후¹ · 고응규[†] · 김성우[†]

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장¹
서울대학교 동물자원과학과²

Cryopreservation of Primordial Germ Cells(PGCs) from Korean Native Chicken(Ogye) Embryos using Commercial Cryoprotectants

Hyun Kim¹, Dong Hun Kim¹, Jae Yong Han², Yoon Jung Do¹,
Jae Hwan Kim¹, Young Sin Kim¹, Hwan Hoo Seong¹, Yeoung Gyu Ko^{1†}, 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 151-921, Korea

ABSTRACT Cryopreservation of poultry semen has been reported, but preservation of female genetic material has not been possible because of the unique anatomical and physiological characteristics of the avian egg. Thus an alternative strategy for conservation of oviparous species of animals must be developed. Recent technological developments for producing germline chimeras by the transfer of primordial germ cells (PGCs) into recipient embryos has enabled the conservation and retrieval of chicken genetic resources in their complete form. In the present study, fertilized eggs were incubated for about 5.5 days to obtain embryos at stage 28. The whole embryo was collected from the germinal gonad using a fine glass micro pipette under a microscope. The PGCs were then purified using MACS method. Two commercially available cryoprotectants (A and B) were used to preserve the PGCs, and EG were used as a control. The average recovery rate of PGCs after thawing was 35.5% and 60.5% with the A and B treatments, respectively. There was no significant difference between B treatments and control, which showed an average recovery rate of 52.8%. However, the recovery rate obtained using A cryoprotectant (35.5%) was significantly lower than using treatment control and B. The average viability of the PGCs after thawing were 77.9% and 77.4% for cryoprotectants A and B, respectively, and the control were was 81.6%. There was no statistically significant difference between the two treatments and control. It was concluded that all of the available cryoprotectants examined in this study could be used for preservation of PGCs from embryos. Further experiments to produce germline chimera from PGCs preserved using this techniques are strongly recommended.

(Key words : chicken, cryopreservation, PGCs, recovery-rate, viability)

서 론

가축유전자원의 보존 및 관리는 여러 국제기구에서 쟁점 화되고 있는데, 특히 CBD(Convention on Biological Diversity: 생물다양성협약) 가축의 유전적 다양성 보존은 지속 가능한 축산업 발전에 필수적인 요소이다. 축산업의 기반이 되는 품종 육성 및 개량 기술에는 품종 다양성이나 개체의 다양성이 전제되어야 한다. 그러나 축산업의 발전은, 특히 가금 산업의 발전은 아이러니하게도 품종 다양성을 극단적으로

줄게 만들고 있으며, 개량 기술도 집단 내 유전적 다양성을 감소시키는 방향으로 작용하고 있는 실정이다. 최근에, 가금류들 중에 일부가 멸종 위험에 처해 있고(Fulton and Delany, 2003), Blackburn은 조류 인플렌자와 같은 치명적이고 잠재적인 전염병 등으로부터 가금산업 전반적으로 위기에 직면해 있다고 보고했다(Blackburn, 2006). 전 세계적으로 다양한 가축 종들이 멸종의 위기에 처해 있거나, 벌써 멸종하고 있다. FAO는 전 세계적으로 분포되어 있는 6,379종의 가축 중에서 약 9%는 위험한 상태에 놓여 있고, 39%는 멸종의

[†] To whom correspondence should be addressed : kim7268@korea.kr

[†] To whom correspondence should be addressed : kog4556@korea.kr

위기에 놓여 있다고 보고하고 있다(FAO, 2003). 가축의 다양성이 전 세계적으로 감소하는 것에 대해서 세계적인 레벨의 관심에 의해서, 유전적인 다양성을 보존할 필요성이 대두되고 있다. 영세 소규모의 형태로 희귀종 혹은 위협에 처해 있는 축산 농가들은 축종의 다양성을 유지하기 위한 보존 프로그램이 필요하다. 그 한 가지 예로 재래종에서 상업적인 특색 혹은 특징적인 유전자의 도입을 통해서 이런 문제점을 해결할 수가 있지만, 이는 지금까지 매우 제한적으로 이루어져왔다.

유전적인 다양성의 보존을 위해서 몇몇 다른 방법들이 있다. 더욱이, 가축들이 자연환경에서 살아있는 상태로 유지, 보존하기 위한 기술이나 방법(*ex situ* live methods) 혹은 희귀종뿐만 아니라, 상업적인 종으로 더욱더 폭 넓게 사용되고 있는 종의 생식세포(germplasm)를 보호 및 유지하기 위해서 *germplasm(ex. situ)*의 동결 보존을 통한 방법들이 발달되어 왔다. Germplasm의 동결 보존은 미래에 활용하기 위한 대립유전자의 다양성의 보존을 위해 매우 바람직하고 좋은 방법으로 여겨진다. 가축의 생식세포 동결 보존은 생체 보존을 대체하여 유전자원을 보다 경제적으로 안전하게 보존할 뿐만 아니라, 증식효율을 조절할 수 있어 집단의 관리에도 효과적으로 활용될 수 있다. 조류에서 생식세포의 동결 보존은 미래의 가금개량 그리고 희귀하거나 여러 가지 멸종 위험에 처한 종을 보호하기 위한 유전적인 물질을 보호하는데 필요하다. 악성 질병 발생이나 사고 등의 멸종 위험에 대비하여 생식세포 동결 보존 기술은 필수적 수단이다. 소수의 품종만으로 생산되는 양계산업의 특성으로 인해 전 세계의 많은 재래종 등이 심각한 멸종 위험에 놓여 있다. 닭, 오리, 거위 그리고 칠면조 등 가금 정액의 동결 보존은 보고되었다(Lake and Stewart, 1978; Hammerstedt and Graham, 1992). 그러나 Hammerstedt and Graham의 연구 결과에 의하면 동결된 정액으로 인공수정을 한 후, 성공적인 수정율은 9~91% 범위의 큰 변이가 있다고 보고했다(Hammerstedt and Graham 1992). 소, 돼지 등의 정액 동결 보존 기술은 상용화되어 이용되고 있으나, 닭 동결정액은 아직 활용이 불가능하여 다양성 보존 방법에 제한요인이 되고 있다. 그 대체 방안으로, 닭의 원시생식세포는 생식선 키메라 발생기술을 이용하여 후대에 유전자를 남기는데 활용될 수 있으므로 포유류의 수정란이식 기술에 비견될 수 있다. 난자와 정자의 전구세포로 알려져 있는 Primordial Germ Cells(PGCs) 원시생식세포의 동결 보존은 조류에서 암컷 그리고 수컷 양쪽의 유전적인 물질을 보호하기 위한 대체 방안으로 강구되고 있다. 최근 닭의 원시생식세포를 이용하여 생식선 키메라를

생산하고, 공여 세포 품종의 후대를 생산함으로써, 닭 PGCs의 동결 보존이 닭 유전자원이 가지고 있던 한계를 극복할 수 있는 대안으로 대두되었다. 닭 PGCs의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고 더불어 수분 함량이 비교적 많아 이를 효과적으로 동결 보존하기 위해서는 특히, 얼음 결정의 형성을 근본적으로 피할 수 있는 유리화 동결법을 검토하였다. 이와 같은 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. 일반적으로 닭 PGCs의 정제방법과 이식 방법에 의한 생식 계열 키메라 제작에 관한 연구 결과를 많은 연구자들이 보고(Natio et al., 1994a; Han et al., 2002; Kino et al., 1997; Naito, 2003)하고 있으나, 닭 PGCs의 동결방법에 관한 직접적인 비교 및 검토는 미진하다고 판단되었기에 본 연구에서 상업적인 각각의 항동해제를 이용해서 한국재래닭(오계) PGCs의 동결 효율성을 증진시키는 방법에 관한 연구를 실시하였다.

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(Ogye) 수탉에서 정액을 각각 채취하여, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 NRC 사양표준에 준한 시판 종계사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 또한, 모든 실험동물은 국립축산과학원의 실험동물사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시되었다.

2. 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. 원시생식선으로부터 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.

3. MACS 법에 의한 분리·정제

Park 등의 실험 방법을 조금 응용하여, 원시생식선은 0.53 mM ethylenediaminetetraacetic 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 et al., 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 µm 격자 크기의 망 구조 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 닭 PGCs(gPGCs)를 순수 분리 및 정제하였다(Kim 등, 2004). 원심분리 후, 생식선 세포(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 Bio-technology, 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 원심분리 하고 나서 상층액을 완전히 제거한다. 아래에 침전된 세포피를 rat anti-mouse IgM microbeads 20 µL가 포함된 100 µL MACS buffer와 천천히 혼합하여 4°C에 15분간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500 µL buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정하고 나서, MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다(Kim et al., 2004).

4. PGCs의 동결-융해실험

각 군의 PGCs 세포 수는 약 200개 정도로 조절하고, 세포의 생존율 측정에는 0.4% Trypan blue 염색액을 이용하여(Freshney, 2005) 효율을 계산하였다. 동결방법은 2가지의 각각 다른 상업적으로 사용되고 있는 동결보호제와 대조군으로 가축배자의 동결 보존에 사용되는 에틸렌글리콜(Ethylene Glycol : EG)을 동결보호물질(cryoprotectant : 이하 CPA)로 하고, 동결방법은 급속동결법(유리화)을 이용해 서로 비교·검토했다.

5. 원시생식세포의 동결과 융해 후의 생존율 측정

15% FBS를 기초로 10% EG(대조군) 및 상업용 동결보호제 A 그리고 B를 첨가해 동일한 동결배지의 농도 조건으로 오계의 gPGCs를 동결 및 융해를 실시하였다. 급속동결방법(유리화)은 PGCs를 10% EG 동결배양액 15 µL에 현탁하고, 5분 간 정치한 후, 8.0 M EG + 7%(w/v) Polyvinyl Pyrrolidone(PVP : average molecular weight 10,000, SIGMA) 동결배양액을 50 µL 첨가하고, 0.25 µL 플라스틱제 스트로(Eco Straw Transparent, FHK, Japan)에 흡입시키고, 선단부를 봉입한 후, 곧바로 액체질소(LN₂)내에 투입했다. 스트로 내에는 1.7 M galactose 동결배양액 150 µL를 사전에 충전해 두었다. 동결과정에서 동결배양액과 PGCs의 반응은 전부 4°C에서 실시했다. 최소한 1달 후에, 액체질소 탱크로부터 동결용 튜브를 끄집어내어, 곧바로 37°C 온탕에 3분간 침지하여 융해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 µL 원심분리용 시험관으로 옮겨서, EG의 희석 제거를 위해서, 10% FBS + DMEM을 30초 간격으로 100 µL, 100 µL, 100 µL, 200 µL, 1,000 µL 그리고 8 µL를 넣고, 각각 240 G에서 6분간 원심분리를 하여 상층액을 제거했다. 세포는 125 µL의 10% FBS + DMEM에 부유시켜, CO₂ 배양기(5% CO₂, 38°C)에서 3시간 배양한 후에, 20 µL를 빼내어 0.4% Trypan blue 염색하여 Trypan blue exclusion method 방법에 의거하여 생존율을 검토하였다(Freshney, 2005). 또한 모든 유리화 실험은 총 8회에 걸친 반복을 실시하였다.

6. 통계분석

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

결과 및 고찰

1. 동결 및 융해후의 닭 PGCs의 회복율

대조구(10% EG + 15% FBS)와 EG를 기본으로 제조된 동결보호제 B 그리고 EG를 기본으로 하지 않은 A를 이용해 동결 및 융해한 후의 원시생식세포의 평균 회복율은 대조구(52.8%), A(35.5%) 그리고 B(60.5%)로 각각 확인하였다(Fig. 1).

이 결과로부터, EG를 동결보호제 혹은 기초 동결액으로 사용한 B처리구 간에는 비슷한 회복율을 보였지만, EG를 기초 동결액으로 하지 않은 A처리구와 비교해서 유의적($P < 0.05$)으로 원시생식세포의 회복율이 높음을 확인했다. 닭 PGCs 동결보

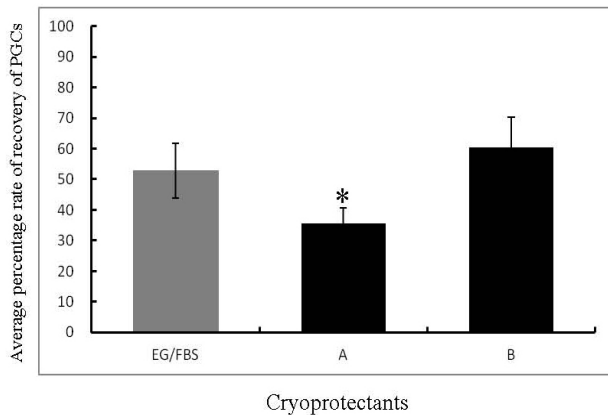


Fig. 1. Average percentage rate of recovery of PGCs after freezing and thawing using different cryoprotectant. Overall averages represent the means \pm standard error (SE). Overall averages in the same row without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$).

존 기술은 아직 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만, 무엇보다 성공적인 닭 PGCs의 동결 보존의 핵심요소는 동결보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 일반적으로 동결보호제의 역할은 동결 시 생기는 얼음 결정의 형성 (Sutton, 1991; Gardner and Lane, 2000) 및 고농도 용매에 의한 세포 손상을 일으키지 않을 수준으로 작아야 하며, 세포 내로 빨리 침투하는 특성을 가지고 있어서 세포의 노출시간을 최대한 짧게 유지할 수 있어서, 이로 인한 독성반응에 의한 손상을 줄일 수 있는 특징을 가지고 있어야 하기 때문이다 (Hey and MarFarlane, 1996). 동결보호제로 많이 사용되는 Ethylene Glycol (EG), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PROH), glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결보호제 (permeable CPA)와 당 (sugars) 또는 polyvinylpyrrolidone (PVP), 혈청알부민 (serum albumin), 혈청 (serum), polyethylene glycol (PEG), ficoll 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비침투성 동결보호제 (non-permeable CPA)로 구분된다 (Lovelock and Bishop, 1959; Boutron, 1984). DMSO의 경우는 세포 내로의 침투속도가 약 20~30 분이며, glycerol은 거의 60분 이상으로 매우 느린 것에 반해서 특히, 분자량이 비교적 적고 세포막 투과성이 다른 동결보호제에 비해 뛰어난 특성 있는 EG를 기본으로 만든 동결액의 경우는 세포 내로의 침투속도가 5~7분으로 매우 빠르다 (Friedler et al., 1988; Martino et al., 1996; Sommerfeld and Niemann, 1999). 이러한 동결 보존은 생쥐, 소, 토끼 등에서 많은 연구가 진행되어 동결 방법이 정립된 반면, 낮은 온도에 특히 민감한 조류 특히, 닭의 경우 이러한 연구보고가 찾아보기 힘들며,

회복율과 생존율에 관한 정확한 성적을 비교 및 검토한 보고도 없는 실정이다. 최근에, Naito 등 (1994b)은 동결·용해 후의 닭 PGCs의 성공적인 회복과 정상적인 세포의 형태를 나타내고, 또한 Tajima 등은 (1998) 동결보호제로써 DMSO의 이용은 gonadal PGCs (gPGCs)를 보존할 수 있는 보고는 있지만, 회복율의 비율을 비교 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 투과성 (EG) 동결보호제를 가지고, 상업적으로 이용되는 동결보호제 A와 B를 이용해, 동결 및 용해 후의 닭 PGCs의 회복율과 생존율을 각각 처음으로 비교 및 검토를 하였다. 본 연구의 결과, 동결 및 용해의 최적의 결과를 얻기 위해서, EG를 기초로 한 동결보호제 B가 닭 PGCs의 보존에 사용될 수 있음을 시사한다. 한편, 동결보호제 A는 가장 낮은 회복율을 보이는 것으로부터 닭 PGCs의 동결 및 용해에 있어 효율적이지 못할 것이라 생각되었다. 한편, 동결방법으로는 낮은 동결보호제의 농도와 완만한 냉각속도 (cooling speed)를 이용하여 세포 내의 수분을 서서히 탈수시키면서 동결하는 완만 동결 (slow cooling method)과 고농도의 동결보호제와 초고속 냉각속도를 사용해, 세포를 -196°C 의 액체질소 (Liquid Nitrogen : LN₂)에 직접 노출시켜 동결 보존을 유도하지만, 실제로는 동결과정에서 세포 내에 얼음 결정이 형성되지 않고 수분이 액체와 고체의 중간인 비결정질과 같은 상태를 유지하도록 하는 기술이다 (Bernard and Fuller, 1996; Fahy et al., 1984; Rall et al., 1987). 이러한 상태를 “유리화”라고 하며, 이를 얻기 위해서는 세포 내 수분이 고농도의 동결보호제를 사용하여 초고속으로 동결시켜 높은 동결율과 응집력을 가지게 하는 방법으로서, 완만 동결과는 달리 동결과정 중에 발생하는 얼음 결정 형성을 막아 난자의 세포질 손상을 줄일 수 있다 (Nakagata, 1989; Hotamisligil et al., 1996; Martino et al., 1996; Vajta et al., 1998). 이와 같은 유리화 동결은 조작이 간단하고, 자동 세포 동결기 (programmed freezer)와 같은 고가의 장비가 필요 없기 때문에 경제적으로 유익하다는 점과 얼음 결정이 원천적으로 형성되지 않아 상해를 최소화 할 수 있다는 장점이 있다. Freshney는 세포내의 물을 격리하기 위해서 친수성의 동결보호제의 사용과 얼음결정의 최소화를 위해서 급속하게 용해하는 것에 의해서 가능하다고 보고하고 있다 (Freshney, 2005). 하지만, 본 연구 결과로부터 방법상의 특성 등으로 고농도 (8.0 M EG)의 동결보호제 처리로 인한 동결 과정 중에 세포 내 얼음 결정 형성과 저온충격 때문에 상해를 입은 세포들이 원심분리 하는 과정에서 침식되고, 이것이 회복율에도 영향을 미친 하나의 요인으로 생각된다. 또한 독성 혹은 삼투압으로 인한 닭 PGCs의 손상을 초래했을 가능

성이 존재한다. 차후에 닭 PGCs 동결보호제의 종류와 처리 시간을 조절하여 세포독성을 줄이는 방법의 확립과 이를 통해 닭 PGCs 내 투과 속도가 높고 독성이 적은 동결보호제를 도입하거나, 투과성과 확산속도가 느리고, 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가 또는 세포 소기관 분열 및 세포분화 중 DNA methylation 등에 영향을 미치는(Rezazadeh et al., 2009) 것으로 알려진 DMSO와 같은 비투과성동결보호제를 조합하여 상대적인 농도변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 방법을 통해서 최종적으로 닭 PGCs에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결-융해 후, 유리화 동결대상인 닭 PGCs를 위한 유리화 동결액 성분의 조합을 통한 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

2. 동결 및 융해한 닭 PGCs의 생존율

동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율에 있어 10% EG + 15% FBS 조합의 대조군과 EG를 기초로 한 B 처리군 그리고 EG를 기초로 하지 않은 A 처리군의 결과가 대조군(81.6%), B(77.4%) 그리고 A(77.9%)로 각각 확인을 하였다(Fig. 2). EG를 기초로 한 동결보호제뿐만 아니라, 다른 동결보호제를 기초로 한 상업용 동결보호제의 사용한 결과, 닭 PGCs의 동결 및 융해 후의 세포생존율은 비슷한 경향을 보였다. 이것은 본 연구에서 사용한 상업적으로 이용되는 동결보호제는 닭 PGCs를 동결 보존하는데 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 지금까지 닭 PGCs 동결 시에 항동해제로서 일반적으로 가장 보편적으로 사용되는 DMSO를 가장 많이 이용해 왔다(Naito et al., 1994b). 하지만 흥미롭게도, 최근(Kobayashi et al., 2003)에 DMSO보다 동결보호제로서 EG

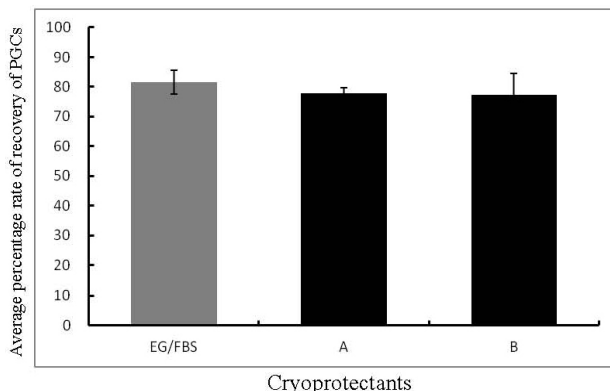


Fig. 2. Average percentage of viability of PGCs after freezing and thawing using different Cryoprotectants. Overall averages represent the means \pm standard error (SE).

를 사용했을 때 동결 및 융해 후의 닭 PGCs 생존율이 73% 였는데, 본 연구 결과 10% EG + 15% FBS 조합의 동결보호제 사용 시, 원시생식선 유래의 PGCs 생존율이 81.6%를 보였다. 이는 기존에 DMSO가 가장 일반적으로 다양한 세포들의 동결 보존에 이용되었는데, Kobayashi 팀이 이전에 보고한 것과 같이 EG는 닭 PGCs를 동결 보존하는데 있어 최적의 동결보호제임을 확인하였다.

Naito et al.(1992)은 또한 배양을 한 메추리 배반엽(blastoderm) 세포의 동결 및 융해 후의 세포 생존율과 배양을 하지 않은 동일한 세포의 세포생존율이 각각 62.7% 그리고 66.0%라고 보고하기도 했다. Kino(1997) 등도 다른 융해 방법을 이용해 DMSO를 이용해 동결 후의 배반엽세포의 생존율이 각각 33~71%라고 보고했다. 이러한 보고들로부터, 닭 PGCs의 생존율이 배반엽세포의 생존율보다 더 높다는 것을 알 수 있다. 또한, Tagami et al.(2007)은 초기 배자 발생의 단계 중에서 혈액 중을 순환하고 있는 닭 PGCs를 동결 및 융해 후의 생존율을 확인한 보고는 있다. 그러나 본 연구는 배자 발생 초기의 원시생식선으로부터 채취한 닭 PGCs는 상업적으로 이용되고 있는 동결보호제를 사용해서도 동결할 수 있다는 것을 확인했고, 생존율에 나쁜 영향을 주지 않고, 액체질소에 성공적으로 보관할 수도 있음을 시사하고 있다.

결론적으로, 본 연구에 사용된 항동해제 전부는 닭 PGCs의 보존을 위해서 사용될 수 있다고 사료된다. 그러나 동결보호제 A는 비록 생존력에는 영향을 끼치지 않지만, 유의적으로 낮은 회복율 때문에 사용하지 않는 게 좋을 것으로 사료된다. 최근의 발생공학 기술은 닭 PGCs를 활용한 생체복원의 가능성을 크게 높이고, 닭 PGCs를 이용한 생식선 키메라 발생기술은 가금류뿐만 아니라, 멸종위험에 놓여있는 야생 조류의 유전적 다양성 보존에도 활용이 가능하다. 이 동결기술을 이용한 닭 PGCs의 보존으로부터 생식선 유래 키메라 생산을 위한 연구에 이용될 것이다. 나아가, 본 연구에서 확인된 동결 보존 기술은 닭 PGCs를 이용한 생식선 키메라를 이용해 희귀한 조류, 오계와 같은 한국 재래닭 그리고 멸종위기에 놓여 있는 야생 조류의 유전적 다양성 보존에 반드시 필요할 것이다.

적 요

가금의 정액 동결 보존은 보고되고 있지만, 큰 난황의 구조 등과 같은 이유로 암컷의 유전물질의 보존은 불가능한 실정이다. 닭에 있어 닭원시생식세포(PGCs)의 동결 보존은

암컷과 수컷 양쪽의 유전물질을 보존할 수 있는 대체 방법이다. 본 연구에서 원시생식선으로부터 분리방법은 5.5일 (stage 28 : 5.5일령(Hamburger and Hamilton, 1951)) 동안 발생한 수정란의 초기배자를 실체 현미경하에서 예리한 핀셋을 이용하여 원시생식선 부분만을 분리한 후, MACS 방법으로 정제하였다. 두 개의 상업적으로 사용되는 동결보호제(A와 B)와 10% EG + 15% FBS를 동결보호제로 하는 대조군을 각각 닭 PGCs의 동결 및 융해에 이용하였다. 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 회복율은 A(35.5%), B(60.5%) 그리고 대조군에서는 52.8%를 각각 확인하였다. 52.8%의 닭 PGCs의 회복율을 보인 대조군과 동결보호제 B 처리군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 두 처리군에 비해 동결보호제 A는 35.5% 유의적으로 낮았다. 하지만, 동결 및 융해 후의 닭 PGCs 생존율은 각각 A(77.9%), B(77.4%) 그리고 대조군(81.6%)으로 보였다. 두 처리군 간에 유의적인 차이는 없었다. 본 연구는 배자 발생 초기의 원시생식선으로부터 채취한 닭 PGCs는 상업적으로 이용되고 있는 동결보호제(A와 B)를 사용해서 동결할 수 있다는 것을 확인했고, 생존율에 나쁜 영향을 주지 않고 액체질소에 성공적으로 보관할 수도 있음을 시사하고 있다.

(색인어 : 한국재래닭 오계, 동결보호제, 원시생식세포, 회복율, 생존율)

감사의 글

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

참고문헌

- Blackburn HD 2006 The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult Sci* 85:210-215.
- Bernard A, Fuller BJ 1996 Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update* 2:193-207.
- 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.
- Fulton JE, Delany ME 2003 Poultry genetic resources-operation rescue needed. *Science* 300:1667-1668.
- FAO 2003 World Watch List for Domestic Animal Diversity 3rd edition (Scherf BD ed.) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT 1984 Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- 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 205-264.
- Hamburger V, Hamilton HL 1951 A series of normal stage in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 8:49-92.
- Hammerstedt RH, Graham JK 1992 Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- 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, MarFarlane DR 1996 Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 33:205-216.
- Hotamisligil S, Toner M, Powers RD 1996 Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 55:161-168.
- Kim JT, Lee SH, Lee YJ, Jo DI 2004 Utility of bolus suture and silicone protector in auricular reconstruction of microtia. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31:9-16.
- Kino K, Pain B, Leibo SP, Cochran M, Clark ME, Etches RJ 1997 Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry 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.
- Lake PE, Stewart JM 1978 Preservation of fowl semen in liquid nitrogen an improved method. *Br Poult Sci* 19:187-197.

- Lovelock JE, Bishop MWH 1959 Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183 :1394-1395.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP 1996 Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54:1059-1069.
- Naito M, Nirasawa K, Oishi T 1992 Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. *Br Poult Sci* 33:449-453.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T 1994a Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 39:153-161.
- Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y, Kuwana T 1994b 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. *J Poult Sci* 40:1-12.
- Nakagata N 1989 High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 87:479-483.
- 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.
- 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.
- Sommerfeld V, Niemann H 1999 Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38:95-105.
- Sutton RL 1991 Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday Trans* 87:101-105.
- Tagami T, Kagami H, Matsubara Y, Harumi T, Naito M, Takeda K, Hanada H, Nirasawa K 2007 Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol Reprod Dev* 74:68-75.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T 1998 Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J Exp Zool* 280:265-267.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M 1998 Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51:53-58.

(접수: 2013. 7. 3, 수정: 2013. 8. 8, 채택: 2013. 8. 13)