

## 한국재래닭(오계)의 원시 생식 세포의 냉동 보존에 있어서 여러 조건의 평가

김 현<sup>1</sup> · 조영무<sup>1</sup> · 한재용<sup>2</sup> · 최성복<sup>1</sup> · 변미정<sup>1</sup> · 김영신<sup>1</sup> · 고응규<sup>1</sup> · 성환후<sup>1\*</sup> · 김성우<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>서울대학교 동물자원학과

### The Evaluation of Various Conditions in the Cryopreservation of Primordial Germ Cells on Korean Native Chicken (Ogye)

Hyun Kim<sup>1</sup>, Young Moo Cho<sup>1</sup>, Jae Yong Han<sup>3</sup>, Sung Bok Choi<sup>1</sup>, Mi Jeong Byun<sup>1</sup>, Young Sin Kim<sup>1</sup>,  
Yeoung-Gyu Ko<sup>1</sup>, Hwan-Hoo Seong<sup>1\*</sup> and Sung Woo Kim<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>WCU Biomodulation Major, Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-741, Korea

**ABSTRACT** Cryopreserving cells which are maintaining their viability are the very complex process. This study has been carried out in order to find the effects of cryopreservation steps and freezing media on the rates of viability of cryopreserved chicken primordial germ cells (PGCs). PGCs obtained from the germinal gonade of 5.5~6 day (stage 28) chick embryos of Korean Ogye (KO) and Commercial breeds (C), using the MACS method were suspended in a freezing medium containing a freezing and protecting agents (e.g. dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and propylene glycol (PG)). Gonads were harvested from stage 28 chick embryos and pooled in groups of 5, 10, 15, 20E embryos, contributing gonads to the cell suspension. The gonadal cells, including PGCs, were then frozen in 1 of the following cryoprotectant treatments : 2.5%, 5%, 10%, 15% and 0% cryoprotectant (DMSO, EG, PG) as a control. Effects of exposure to slow freezing and vitrification, with different concentrations of the cryoprotectant solution, were examined. After vitrification and slow freezing, survival rates of the frozen-thawed PGCs from the 10% EG plus FBS treatment were 85.63%, and 66.14% ( $p<0.05$ ), respectively. The viability of PGCs after freeze-thawing was significantly higher for 10% EG plus FBS treatment than for 10% PG + FBS treatment ( $p<0.05$ ) (85.63% vs 66.81%) by vitrification. This study established a method for preserving chicken PGCs that enables systematic storage and labeling of cryopreserved PGCs in liquid (LN<sub>2</sub>) at a germplasm 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), vitrification, slow freezing, viability, Korean native chicken (Ogye))

## 서 론

자연 및 자연자원 보존 국제 연맹(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources : IUCN)의 조사 보고서에 의하면 지구상에 살아있는 척추동물 종의 개수가 64,283개인데, 놀랍게도 조류가 차지하는 비율이 10,064종으로 구성되어 있다고 보고하고 있다(IUCN, 2012). 이는 조류 종의 중요한 특징 중 하나인 유전적인 다양성이 상당히 높다는 것을 나타내고 있다. 그러나 심각한 환경오염, 무분별한 산림 채벌 등에 의해서 조류들의 삶의 터전이 점점

파괴되어 없어지고 있는 실정이다. 실제 제초제, 농약 그리고 살충제 등과 같은 독성 화학물질의 생물오염(biocondensation)에 의해서 최근에 멸종위기에 처한 종들이 점점 늘어나고 있는 아주 심각한 상태라고 보고하고 있다(Kroll, 2001; Fulton and Delany, 2003). 게다가 Blackburn 등(2006)은 치명적이고 잠재적인 전염병인 조류 인플루엔자 등으로부터 가금산업 전반적으로 위기에 직면해 있다고 보고했다. 가축 유전자원의 보존 및 관리는 여러 국제기구에서 쟁점화되고 있는데 특히, 국가 간 유전자원에 대한 접근과 지식재산권과 같은 이익 공유 문제가 야기되면서 선진국과 개발도상국 간

\* To whom correspondence should be addressed : kim7268@korea.kr, seonghh@korea.kr

의 유전자원에 대한 소유권 분쟁이 시작되었고, 지난 2010년에는 CBD(Convention on Biological Diversity : 생물다양성 협약) “나고야 의정서”의 채택으로 축산업 발전에 필수적인 요소인 유전자원의 다양성 보존의 중요성이 더욱더 커지고 있는 실정이다. 그러나 닭을 포함한 가금류에서는 고병원성 조류인플루엔자(HPAI) 등과 같은 다양한 악성 질병의 발생과 함께 지구온난화에 기인된 고온화 그리고 소비자의 기호 변화 등과 같은 문제로 인하여 종의 다양성의 감소가 심각한 실정이다. 또한 경제적인 논리만을 내세운 결과, 체성장 혹은 수정란 생산을 등과 같은 특성의 생산 특성에 초점을 맞춘 제한적이고 집중적인 가금 육종 선발 프로그램 등은 감소를 더욱 가속화 시키고 있는 현실이다. 현재 널리 이용되고 있는 소수의 품종, 그리고 집단 내 유전적 다양성의 감소는 기후 변화, 다양한 악성 질병 발생, 소비자의 기호 변화 등 여러 가지 변화요인을 고려할 때, 장기적으로 가금산업의 지속 가능성을 위협할 수 있다. 가금산업에 이용되고 있는 획일화된 가금품종 이외에 한국 재래닭을 포함하는 다양한 유전적 변이성의 확보가 향후, 가금산업이 성공할 수 있는 가장 중요한 열쇠이다.

유전적인 다양성의 보존을 위한 방법 중에 특히, 가축의 생식 세포(germplasm) 동결 보존은 생체 보존을 대체하여 유전자원을 보다 경제적으로 안전하게 보존할 뿐만 아니라, 증식 효율을 조절할 수 있어 집단의 관리에도 효과적으로 활용될 수 있다. Wilmut가 “복제양 돌리”를 탄생(Wilmut et al., 1997)시킨 후, 체세포 핵 이식 기술은 멸종에 처한 위기 종의 유전자원 보존의 중요한 방법으로 여겨져 왔다. 몇몇의 경우에는 멸종된 동물의 종을 다시 복원시키는 중요한 수단으로 여겨지고 있다. 그러나 포유류의 핵 이식 기술은 직접적으로 조류에 적용을 할 수가 없다. 왜냐하면 가장 근원적인 문제는 난황의 구조적 그리고 해부생리적인 특징이 다르기 때문이다. 또한 닭 동결 정액은 아직 활용이 불가능하여 다양성 보존 방법에 제한요인이 되고 있다. 그 대체 방안으로 닭의 원시 생식 세포는 생식선 키메라 발생 기술을 이용하여 후대에 유전자를 남기는데 활용될 수 있으므로 포유류의 수정란이식 기술에 비견될 수 있다(Naito, 2003). 난자와 정자의 전구세포로 알려져 있는 primordial germ cells (이하 : PGCs) 원시 생식 세포의 동결 보존은 조류에서 암컷 그리고 수컷 양쪽의 유전적인 물질을 보호하기 위한 대체 방안으로 강구되고 있다. 최근 닭 PGCs를 이용하여 생식선 키메라를 생산하고, 공여 세포 품종의 후대를 생산함으로써 닭 PGCs의 동결 보존이 닭 유전자원이 가지고 있던 한계를 극복할 수 있는 대안으로 대두되었다. Tajima 등(2003)은 흰

색 White Leghorn에서 Rhode Island Red로 PGCs를 전이시키는 것에 의해서 생식선 키메라(germline chimeras)를 최초로 제작하였다. 다른 연구자에 의한 보고에서도(Kino et al., 1997; Han et al., 2002; Naito, 2003; Petite, 2006) stage 13~16(Hamburger and Hamilton, 1951)의 초기 배자의 대동맥의 혈액으로부터 닭 PGCs를 분리하고, 개체 복원을 위한 키메라 제작은 보존 세포를 발생 단계가 같은 수여배자의 혈관으로 이식하는 방법을 이용하여 생식선 키메라를 형성하였다. 특히, Natio 등(1994)은 최초로 동결 보존된 닭 PGCs를 이식해서 생식선 키메라를 제작하였다. Tajima 등(1998)은 또한, 발생 5일째 배자부터 동결 보존된 닭 원시 생식선 유래 닭 PGCs를 이용하여 생식선 유래 키메라를 제작하였다. 이러한 연구들 모두는 완만 동결(Slow-Freezing) 법을 사용하였다.

1776년 Spallanzani가 처음으로 종마의 정자 동결을 시도한 이래 많은 분야에서 동결 방법이 연구되고 발전되어 왔다. 초기배아의 동결에 관한 연구는 1972년 Whittingham et al(1972)은 dimethyl sulfoxide(이하 : DMSO)를 사용하여 완만 동결에 의해 생쥐 배아를 빙 결점 이하의 온도에서 장기간 동결 보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다. 동결 보존 후 원시 생식 세포의 생존율에 있어서 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결 및 융해 과정 중 사용되는 동해 방지제의 종류, 농도 및 처리 시간이다. 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동해 방지제로서 DMSO, glycerol 그리고 propandiol(1,2-PROH)를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등(1996)은 소 성숙 난자를 ethylene glycol(이하 : EG)을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 EG을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동해 방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 그리고 알부민이 있으나, glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Zhu et al., 1993; Rayos et al., 1994; Kim et al., 1996). 이러한 동결 보존은 생쥐, 소 그리고 토끼 등에서 많은 연구가 진행되어 동결 방법이 정립된 반면, 낮은 온도에 특히 민감한 조류 특히, 닭의 경우 이러한 연구 보고가 찾아보기 힘들며, 생존율에 관한 정확한 성적을 비교 및 검토한 보고도 없는 실정이다.

지금까지 많은 연구자들이 배반엽세포와 초기 배자 발생 중의 한 단계인 혈액을 순환 중인 circulating PGC(cPGC)를 이용하여 동결에 관한 연구(Yasuda et al., 1992; Kino et al., 1997; Pokorny, 2002)를 수행하였다. 본 연구와 동일한 발생 단계인 생식선 유래의 gonadal PGC(gPGC)를 이용한 연구(Natio et al., 1994; Natio, 2003; Zhao and Kuwana, 2003; Mozdziaik et al., 2005)도 지속적으로 실시하였으나, 닭 유전

자원으로써 닭 PGCs의 가장 안정적이고, 효율적인 동결 보존하는 방법에 대해서는 아직까지 명확하지가 않다. 그러므로 닭의 유전자원 보존을 위해서는 먼저, 키메라 생산 효율을 높이는 것이 중요하다. 그러기 위해서는 우선, 가장 기초적인 닭 PGCs의 장기 동결 보존의 효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 또한 닭 PGCs의 정제 방법과 이식 방법에 의한 생식 계열 키메라 제작에 관한 연구 결과는 앞에서 기술한 것처럼 많이 보고되고 있으나, 한국 재래닭 및 상업용 닭 PGCs의 동결 방법에 관한 직접적인 비교 및 검토는 미흡하다고 판단되었기에, 본 연구에서 유리화 동결법과 완만 동결법을 이용해서 한국 재래닭(오계)과 상업용 닭 PGCs의 동결 효율성을 증진시키는 방법에 관한 연구를 실시하였다. 한국 재래닭 PGCs 동결 결과는 향후 개체 및 계통 복원을 위한 키메라 생산 효율을 향상시키는데 있어 기초 자료로서 매우 유용하게 활용될 수 있길 기대하면서 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 재료 및 시험계의 사양 관리

본 실험에 사용된 공시계는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국 재래닭 3원 교잡종과 가축 유전자원시험장에서 보유하고 있는 44 주령의 한국재래닭 오계종(KO) 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 부화기에 입란하고 5.5~6 일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양 관리는 한국가금사양표준의 NRC 사양 표준에 준한 시판 종계 사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 그리고 전라북도 남원시 소재의 일반양계농가의 44~45주령의 한국육종협회3호종(상업용 닭 : C)의 수정란을 공급 받아 시험에 공시했다. 또한, 모든 공시계는 국립축산과학원의 실험동물 사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시되었다.

### 2. 실험군 설계

동결배지의 기초가 되는 혈청으로서 소 태아 혈청(이하 : FBS)를 기초로 하고, 동결 보호제로서 DMSO, EG 그리고 PG의 세 가지를 각각 사용하였다. 그리고 원시 생식 세포에 대해서 0%(대조군), 2.5%, 5%, 10%, 15%를 첨가한 동결용 배지와 동결용 배지의 기초가 되는 혈청으로써 15% FBS를 기초로 하였다. 그리고 각 군의 원시 생식 세포 수는 약 250~350개 정도로 조절하고, 동결 용기는 동결용 튜브(NALGENE,

Cat. No. 5100-0001) 그리고 동결 방법은 유리화 동결법(rapid freezing, RF)과 완만 동결법(slow freezing, SF)을 이용하고, 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포 생존율 측정은 0.4% 트리판블루 염색법(Freshney, 2005)을 이용해 서로 비교 검토하였다.

#### 1) 실험 1 : 동결 용기별 효율

닭 원시 생식 세포를 동결할 때의 동결 용기는 0.25 mL 동결용 플라스틱 스트로(EcoStraw transparent, FHK, Japan), 0.5 mL 동결용 플라스틱 스트로(EcoStraw transparent, FHK, Japan) 그리고 동결용 튜브 (NALGENE, Cat. No. 5100-0001)를 각각 이용해, 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 생존율을 통해 동결 용기별 최적의 효율을 비교 및 검토하였다.

#### 2) 실험 2 : 동결용 튜브당 공여된 원시 생식 세포의 배자의 수

동결용 튜브당 공여된 초기 배자 수는 5개, 10개, 15개 그리고 20개로 조정된 실험구를 설정한 후, 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 생존율을 통해 튜브당 최적의 배자의 수를 비교 및 검토하였다.

#### 3) 실험 3 : EG, DMSO, PG의 동결 효율 비교

실험 1에서 최적의 동결 배지의 농도, 실험 2에서 가장 효율이 높은 동결 용기를 선택하고, 마지막으로 실험 3에서는 최적의 원시 생식 세포의 배자의 수를 확인한 다음, 동결 보호제 DMSO, EG 그리고 PG 간의 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 생존율을 확인했다.

### 3. 원시 생식 세포의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 사육 중인 실험 축을 사용하여 Hamburger-Hamilton(1951)의 배 발달 단계에 기초하여 37.8℃, 상대 습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 발생 초기 배자로부터 원시 생식선의 분리 방법은 5.5일(stage 28(Hamburger and Hamilton, 1951)) 동안 발생한 초기 배자를 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>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 원시 생식선 부분만을 분리한 후, MACS법에 의해 분리 및 순수 정제를 하기 위해 이를 1.5 mL 튜브에 수집하여 실온에 두었다.

### 4. MACS법에 의한 분리 및 정제

Park 등의 실험 방법을 조금 응용하여, 원시 생식선은 0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 함유된 0.05% (v : v) 트립신 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 1.5 mL 원심 분리 튜브에 넣어 두었다(Park et al., 2003). 그리고 튜브는 37.8°C에 2분 간 배양 처리를 했다. 트립신 처리 후, 트립신-EDTA의 불활성을 위해서 10% 소 태아 혈청(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 원심 분리를 했다. MiniMACS(magnetic-activated cell sorting) system(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용해서 원시 생식선 유래의 닭 원시 생식 세포(gPGCs)를 순수 분리 및 정제하였다(Kim et al., 2004). 원심 분리 후, 생식선 세포(한 개의 tube 당  $4 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ )는 SSEA-1 항체를 이용하여 MACS 방법으로 순수 gPGCs를 정제하였다. 닭 생식선 유래 세포 혼합물을 원시 생식 세포 특이항체로 알려진 anti-stage specific embryo antigen(anti-SSEA)-1 항체(Santa Cruz Biotechnology, mouse IgM isotype: SSEA-1, MC-480)를 5% NGS/PBS에 1 : 200으로 희석하여 실온 20~25°C에서 20분 간 반응을 시켰다. PBS에 0.5% BSA와 2 mM EDTA가 함유된 1 mL MACS buffer로 세정을 하고, 200 g에 5분간 원심 분리를 수행한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 아래에 침전된 세포피를 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. 원시 생식 세포의 동결·융해 후의 생존율 측정

동결 보호제의 동결과 융해의 기본 용액은 0.5% 소 혈청 알부민(Sigma)를 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Sigma)를 사용했다. 15% FBS를 기초로 EG, DMSO 및 PG를 0%(대조군), 2.5% 5%, 10% 그리고 15%를 첨가한 동결 배지의 농도 조건으로 오계의 gPGCs를 동결 및 융해를 실시하였다. 동결용 튜브(Corning, Cat. No. 25723-1)에 4°C 조건을 유지하면서 300 µL의 동결 배지에 원시 생식 세포 6~40개를 주입하고, 4~5분 간 평형을 유지한 다음, 가능한 30~40초가 넘지 않도록 재빨리 액체 질소(LN<sub>2</sub>)에 침지하였으며, 동결용 튜브에 넣은 후 액체 질소통에 옮기기까지 1분 30초~2분을 초과하지 않았다. 한편, 완만 동결 방법은 닭 원시 생식 세포를 2.0M EG 50 µL에 현탁해서 두고,

기본 동결 용액인 D-PBS(+0.5% BSA) 150 µL를 혼합하여 0.25 mL 동결용 플라스틱 스트로(EcoStraw transparent, FHK, Japan)에 흡입하고, 선단부를 봉입해서, 프로그램 동결기(Freezer Control CL-863, Cryologic, Australia)에서 동결하였다. 동결 과정 중 -7°C에서 10분 간 정치한 다음, 초당 -0.6°C 속도로 -35°C까지 냉각하고, 액체 질소 내로 직접 침지하였다. 스트로 내에는 사전에 D-PBS를 충원해 두고 흡입 시에 동결 보호제와 섞이지 않게 하기 위해서 기포를 약 2 mL 정도 채워 구분하였다.

최소한 1~2달 후에, 액체질소 탱크로부터 동결 보존된 동결용 플라스틱 스트로 및 동결용 튜브를 끄집어내어, 공기 중에서 약 5초 간 상온에 유지하고 나서 37°C 온탕에 3분 간 침지하여 융해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 mL 원심 분리용 시험관으로 옮겨서 DMSO, EG 및 PG의 희석 제거를 위해서, 15% FBS + DMEM를 30초 간격으로 100 µL, 100 µL, 100 µL, 200 µL, 1,000 µL 그리고 8 mL를 넣고, 각각 240 G에서 6분 간 원심 분리를 하여 상층액과 함께 동결 보호제를 제거하였다. 원시 생식 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 빼내어 0.4% 트리판 블루로 염색하여 생존율을 검토하였으며(Freshney, 2005), 유리화 및 완만 동결 실험은 각각 8회에 걸친 반복 테스트를 실시하였다.

#### 6. 통계 분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료들의 통계 분석은 Statistical Analysis System(SAS release ver. 8.2, 2002)의 General Linear Model(GLM) procedur를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구 간에 유의성은 Duncan's multiple range-test(Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였으며, 각 요인들의 상관관계의 유의성 검정은 Pearson's correlation coefficient를 활용하였다.

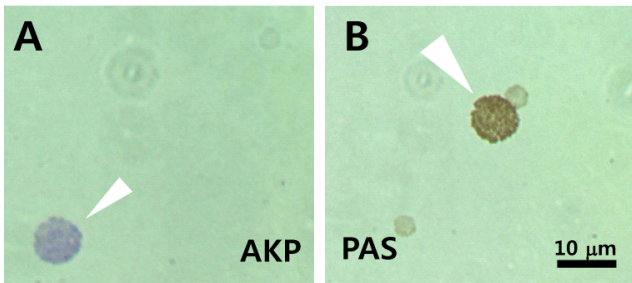
## 결 과

#### 1. 실험 1 : 동결 보존 용기가 원시 생식 세포의 동결 및 융해 후 생존율에 미치는 영향

동결 보존 용기로서 동결용 플라스틱 스트로(0.25 mL, 0.5 mL) 및 동결용 튜브를 이용한 유리화 방법 그리고 완만 동결을 이용한 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 세포 생존율을 확인하기 위하여 먼저, 초기 배지의 발생 28단계에서 채취한 원시 생식 세포를 MACS 방법을 이용한 순수 분리 및 정제 전-후의 원시 생식 세포의 형태학적인 특징을 Alkaline

phosphatase(AKP) 및 Periodic acid-Schiff(PAS) 염색한 결과를 Fig. 1에 각각 나타내었다. MACS 방법을 이용해 순수 분리하기 전의 원시 생식 세포의 양상(A) 그리고 정제 후의 원시 생식 세포의 양상(B, C, D)을 확인하였다. 그리고 AKP와 PAS 양성인 원시 생식 세포를 각각 Fig. 1(C)와 (D)에 나타내었다. 그리고 순수 분리 정제 효율을 Table 1에 각각 나타내었다. 원시 생식 세포의 동결 및 용해 후의 원시 생식 세포의 순도는 MACS 정제 전, 살아있는 오계 체세포의 비율이 약 91.2%를 보인데 반하여, 상업용 닭의 체세포의 비율은 96.9%로 더 높음을 확인했다. 정제 후, 생존한 원시 생식 세포의 비율은 오계(87.1%)와 상업용 닭(86.3%)를 보였다.

동결 보존 용기에 따른 유리화 및 용해 후의 원시 생식 세포의 세포 생존의 비교를 Fig. 2A에 나타내었고, 완만 동결 및 용해 후의 세포생존의 비교 결과는 Fig. 2B에 각각 나타내었다. 먼저, 유리화 동결 방법을 사용한 결과, 한국 재래 닭(오계) 품종의 경우, 0.25 mL 동결용 플라스틱 스트로 사용 시, 68.23% 그리고 0.5 mL의 경우, 76.42%의 원시 생식

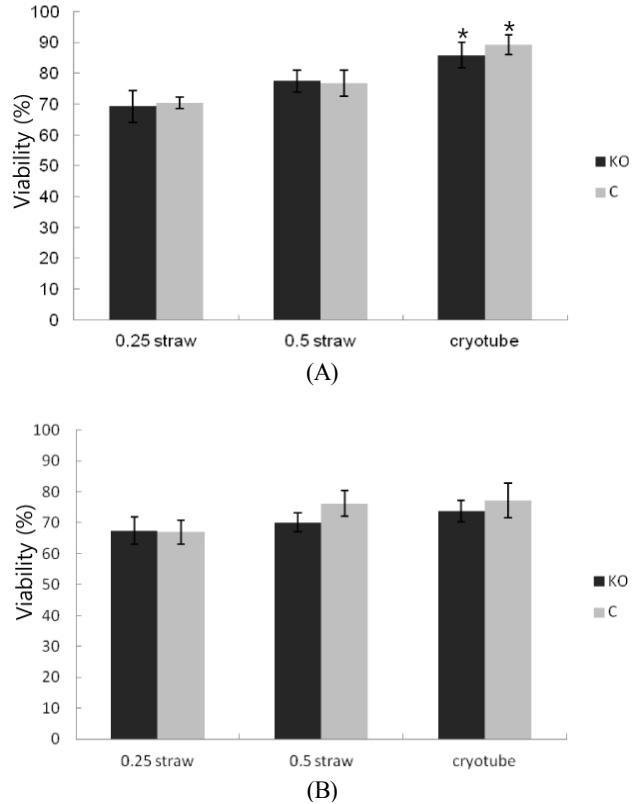


**Fig. 1.** Morphological characteristics of PGCs and alkaline phosphatase (AKP)/periodic acid-Schiff (PAS) stained PGCs after cryopreservation. (A) and (B) show frozen-thawed PGCs with AKP or PAS staining, respectively. White arrowhead : AKP and PAS stained gPGCs. gPGCs : Gondal primordial germ cells. Scale bars = 10 mm in (A) and (B).

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

Sources (embryonic age)	Breed	Viable somatic cells (%)	Viable PGCs (%)
Embryonic gonads (5.5 day incubation)	Ogye	91.2±3.8	87.1±4.2
	Commercial chicken	96.9±1.1	86.3±1.2

The purity is the ratio of PGCs in the total cell population. In 8 repeated experiments on 5.5-day-old embryos, the average purity of PGCs±S.D. was obtained.



**Fig. 2.** Comparison of survival rates of vitrified-thawed PGCs according to the freezing vessel.

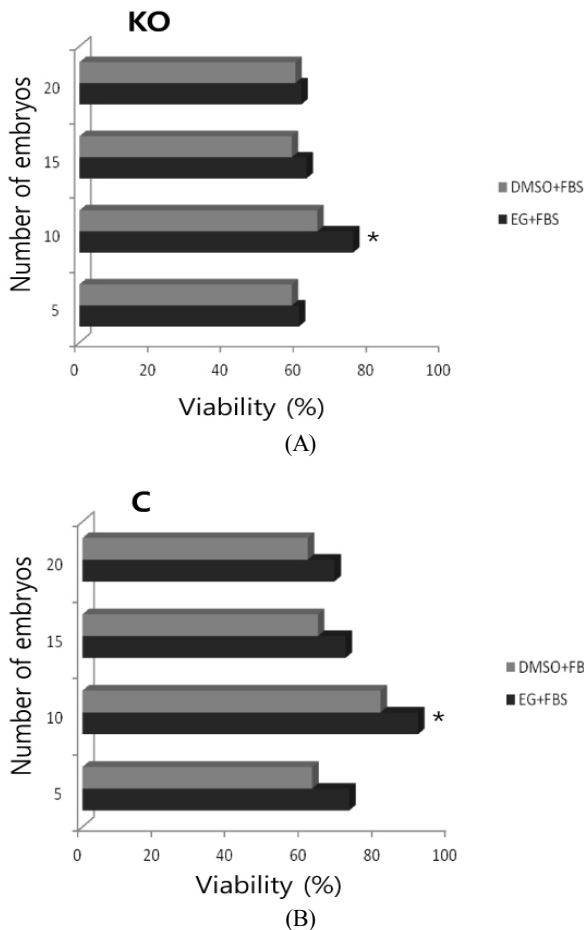
Each column represents the mean±SE(n=8). \*  $p < 0.05$ . EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, PG : propylene glycol. (A) column indicates vitrification and (B) represents the slow freezing, respectively.

세포의 세포 생존율을 보였다. 동결용 플라스틱 스트로 처리구 간에는 유의적인 차이는 없었지만, 직경이 두 배 큰 0.5 mL 사용 시, 생존율이 더 높음을 알 수 있었다. 동결용 튜브 처리군의 경우, 원시 생식 세포의 세포 생존율이 85.39%로 동결용 플라스틱 스트로 처리군과 비교해서 유의적으로 높음을 확인하였다. 한편, 완만 동결 방법에 있어 동결 및 용해 후의 생존율은 0.25 mL 동결용 플라스틱 스트로 사용 시 70.36% 그리고 0.5 mL의 경우 75.69%, 마지막으로 동결용 튜브의 사용 시 87.32%의 원시 생식 세포의 세포 생존을 보였다. 품종간의 비교는 한국육종협회3호종 닭이 오계종보다 높음을 확인했다. 본 연구에서의 유리화 동결 및 완만 동결의 연구를 수행하기 위해서 최적의 효율적인 동결 용기는 동결용 튜브임을 확인하였다. 또한, 한국 재래닭으로 잘 알려져 있는 오계종과 함께 상업용 닭으로 개량된 한국육종협회3호종 닭의 두 품종 간의 유리화 동결 그리고 완만 동결 및 용해 후의 사용 동결 용기별 원시 생식 세포의 생존율은

비슷한 경향을 보였고, 두 품종 간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

## 2. 실험 2 : 동결용 튜브당 공여된 최적의 원시 생식 세포의 배자의 수

동결용 튜브당 공여된 최적의 원시 생식 세포 배자 생존율을 오계(Fig. 3A) 그리고 한국육종협회3호종(Fig. 3B)에 각각 나타내었다. 먼저, 오계의 튜브당 10개의 배자일 경우, 동결 및 융해 후의 세포 생존율은 동결 보호제로 EG + FBS 처리군(75.23%)이 유의적( $p < 0.05$ )으로 DMSO + FBS 처리군(65.36%)보다 높았다(Fig. 3A). 상업용 닭으로 개량된 한국육종협회3호종 닭의 경우도 이와 유사한 경향을 보였다(Fig. 3B).



**Fig. 3.** Percentage of viable primordial germ cells (PGC) by number of embryos per straw.

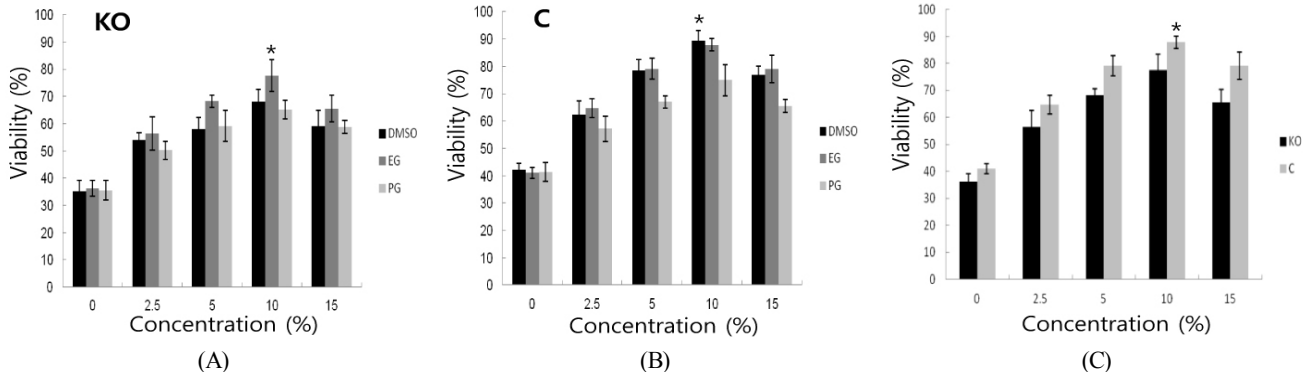
Values were determined by dividing the number of viable PGC in a straw by the total number of PGC in that straw. Values are least square means  $\pm$  SE. Values without a common letter are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

## 3. 실험3 : DMSO, EG, PG의 동결 및 융해 후 생존율의 비교

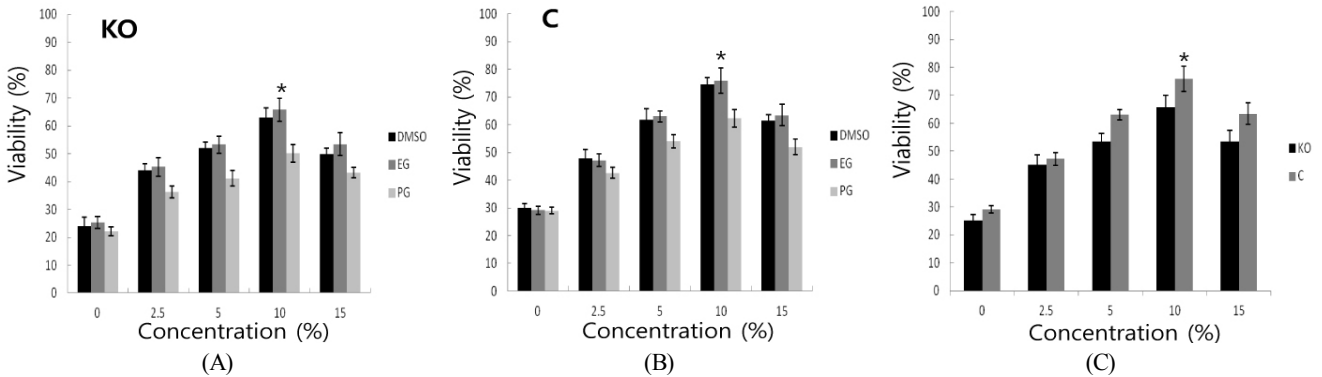
유리화 동결 및 융해 후의 DMSO, EG 및 PG 첨가에 의한 동결 보호제의 농도별 효율을 확인한 결과를 Fig. 4 (A) (오계종) 그리고 (B) (한국육종협회3호종)에 각각 나타내었다. 그 결과, 먼저 두 품종 간에 있어 대조구(0%)와 비교해 2.5%, 5%, 10% 그리고 15%의 DMSO, EG 및 PG 처리구에서 동결 및 융해 후의 세포 생존율이 높은 경향을 나타내었다. 또한, 2.5%, 5%, 10% 그리고 15% 각각의 EG를 동결 보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 DMSO와 PG 처리군보다 동결 및 융해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히, 10% EG 처리군에서 85.63%로 동일한 농도의 PG 처리군(66.81%)보다 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 가장 높은 생존율을 보였다. 한편, 상업용 닭 (한국육종협회3호종)에서도 오계종과 비슷한 경향의 결과를 확인하였다. 이상의 결과들로부터 유리화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 최적의 동결 보호제로서 사용 가능성을 확인하였다. 한편, 완만 동결 및 융해 후의 DMSO, EG 및 PG 첨가에 의한 동결 보호제의 농도별 효율을 확인한 결과를 Fig. 5 (A) (오계종) 그리고 (B) (한국육종협회3호종)에 각각 나타내었다. 그 결과, 먼저 두 품종 간에 있어 대조구(0%)와 비교해 2.5%, 5%, 10% 그리고 15%의 DMSO, EG 및 PG 처리구에서 동결 및 융해 후의 세포 생존율이 유리화 동결 처리 방법과 유사하게 높은 경향을 나타내었다. 또한, 2.5%, 5%, 10% 그리고 15% 각각의 EG를 동결 보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 DMSO와 PG 처리군보다 동결 및 융해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 85.63%의 세포 생존율을 보인 유리화 처리 방법보다는 낮았지만, 10% EG 처리군에서 66.14%로 동일한 농도의 PG 처리군(50.11%)보다 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 가장 높은 생존율을 보였다. 이상의 결과들로부터 유리화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 최적의 동결 보호제로서 사용 가능성을 확인하였다.

## 고 찰

본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서, 먼저 오계의 원시 생식 세포 유리화 동결 및 완만 동결 방법에 의한 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 생존율 향상에 초점을 맞추고, 비교 및 검토하였다. 닭 원시 생식 세포 동결 보존 기술은 아직 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만, 무엇보다 성공적인 닭 원시 생식 세포의 동결 보존의 핵심 요



**Fig. 4.** The viability of primordial germ cells (PGC) after vitrification following treatment with various combinations of cryoprotectant (EG, DMSO and PG) between KO C. Concentration (%) means the concentration of cryoprotectant (EG, DMSO and PG). Each column indicates the means±SE standard error (SE) (n=8). \* P<0.05(compared with control). KO : Korean Ogye, C : commercial chicken, EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, PG : propylene glycol.



**Fig. 5.** The viability of primordial germ cells (PGC) after slow freezing-thaw following treatment with various combinations of cryoprotectant (EG, DMSO and PG) between KO C. Concentration (%) means the concentration of cryoprotectant (EG, DMSO and PG). Each column indicates the means±SE standard error (SE) (n=8). \* P<0.05 (compared with control). KO : Korean Ogye, C : commercial chicken, EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, PG : propylene glycol.

소는 동결 보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 동결 보호제로 많이 사용되어온 EG, PG, DMSO, glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결 보호제와 당 또는 polyvinylpyrrolidone(PVP), 혈청알부민, 혈청 polyethylene glycol(PEG), ficoll 거대 분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비 침투성 동결 보호제로 구분된다(Lovelock et al., 1959; Boutron et al., 1984). 본 연구에서는 투과성(EG, PG) 및 비 투과성 억제제인 혈청알부민, 혈청을 가지고, 일반적인 두 가지의 동결 방법인 유리화 그리고 완만 동결 및 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율에 관한 검토를 실시하였다. 본 연구에서도 EG를 동결 보호제로 사용해 유리화 한 처리군이 유리화 처리 및 완만 동결 방법에서 동결 보호제로써 EG의 사용이 PG군보다 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율

이 각각 높음을 확인했다. 특히, 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군이 다른 군과 비교해서 유의적으로 가장 높은 생존율을 확인했다. 이는 Friedler 등(1988)이 세포 내로의 침투 속도가 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 혹시, 빠른 침투에 의한 삼투압 평형에 도달한 결과, 삼투압 충격의 최소화 등에 기인해서 10% EG 처리군에서 닭 원시 생식 세포에 미치는 악영향을 최소화 했을 가능성이 생각된다. 이는 Meryman 등(2007)이 동결 속도, 삼투압에 의한 세포 손상 그리고 세포와 동결 보호제의 조합이 세포 동결 시에 중요한 요소라고 보고했는데, 닭 원시 생식 세포의 유리화 동

결 과정 중에서 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군이 삼투압에 의한 세포 손상이 감소되었을 가능성이 유추된다. Bautista<sup>b</sup> 등(1998)은 동결 보호제로서 EG이 포유동물의 생식 세포인 난자의 유리화 동결에 가장 효율적이었다고 보고했다. 또한 EG를 이용하여 동결 보존한 난자 및 배아가 발생이 더 잘 진행되었다는 보고도 있다(Chi et al, 2002; Kim et al, 2004). 동결 방법과 세포의 종류가 조금씩 달라 본 연구의 결과와 직접적으로 비교하긴 힘들지만, PG와 DMSO의 경우에는 다른 동결 보호제에 비하여 확산 속도가 느리며, 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가(Takase, et al 1992), 세포 소기관 분열 및 세포 분화 중 DNA 메틸화 등에 영향을 미치는 등과 같은 단점의 연구 결과들이 보고된 바 있다(Kotobuki et al, 2005; Rezazadeh et al, 2009).

성공적인 유리화 동결법을 수행하기 위해서는 동결 보호 용액의 농도와 종류, 동결에 사용된 배아 및 세포의 질 등과 함께 중요한 요소 중에 하나인 유리화 동결을 위해 사용된 보관 용기도 고려되어야 한다(Kasai et al, 1992; 2002). 본 연구에서 소, 돼지 그리고 닭 등의 정액의 동결에 많이 사용되는 동결용 플라스틱 스트로와 함께 동결용 튜브를 이용해 유리화 동결 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율에 관해서 조사를 하였다. 그 결과, 동결용 튜브를 보관 용기로 사용했을 때가 세포 생존율이 가장 높은 것으로부터 닭 원시 생식 세포의 유리화 방법에 의한 동결 시에 보관 용기로서 동결용 튜브가 최적임을 시사했다. 이전에 Naito et al.(1994)은 동결 보호제로서 DMSO를 이용한 완만 동결법으로 40  $\mu$ L의 동결 보호제에 대해서 원시 생식 세포를 약 3,000개라고 하는 고밀도에서 동결 보존을 실시하였기 때문에 세밀한 비교는 할 수 없었을 것으로 추정되며, 본 연구에서 이용된 원시 생식 세포의 유리화에 관한 결과와 직접적인 비교는 힘들지만, EG가 일반적으로 일반 세포주의 동결에 동결 보호제로써 많이 이용되어 왔던 DMSO와 비슷하거나 혹은 동결 및 융해 후의 세포 생존율이 보다 더 높을 가능성이 생각된다. 또한, 동일한 10%의 농도의 EG를 동결 보호제로 이용할 경우, 동결 보존 용기로서 동결용 튜브를 사용한 군이 동결용 플라스틱 스트로(0.25 mL 혹은 0.5 mL)군보다 유리화 동결 및 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율이 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 이것은 동결용 스트로의 벽이 더 얇기 때문에 온도 변화가 신속하게 전달되며, 세포에 대하여 정확한 온도 조절로 부하가 작을 것으로 예상되어, 동결 튜브를 이용하는 결과보다 유리화 동결 및 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율이 우수할 것이라고 예상된 것과 상반되는 결과를 관찰하였다. 이는 오히려, 동결용 스트로 용기의

얇은 벽에 의하여 원시 생식 세포의 동결 과정과 동결 후 보존 과정 및 융해 시의 온도 변화에 따른 충격 등과 같은 환경적인 요인으로 인하여 닭 원시 생식 세포가 많은 손상을 입었을 가능성도 배제할 수가 없다. 동결 용액이 노출되는 온도, 보관 용기의 열전도율, 동결 용액의 양, 연구자의 숙련도 그리고 배아 발달 시기 및 질 등이 생식 세포 및 배아 등의 유리화 동결의 결과에 많은 영향을 미친다고 보고되고 있다(Kuleshova et al, 1999, 2001; Lee et al, 2009). 최근에 열전도율을 증진시키는 방법 중 하나인 반고체 상태인 슬러시 상태의 질소(slushnitrogen, SN<sub>2</sub>)를 사용하여 난자와 배아의 유리화 동결 후 생존율과 배아 발생의 증진을 보고한 연구도 있다(Arav et al, 2002; Yoon et al, 2007; Yavin et al, 2009). 하지만, 닭 원시 생식 세포에서는 미흡한 실정이다. 따라서 유리화 동결법이 더욱 효과적으로 널리 이용할 수 있게 하기 위해서는 유리화 동결액 성분의 세밀한 조합과 함께 다양한 동결 방법의 비교 검토 과정 등의 전략이 반드시 추가되어야 할 것으로 생각된다.

닭 원시 생식 세포의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고, 더불어 수분 함유량이 비교적 많아 이를 효과적으로 동결 보존하기 위해서는 특히, 얼음 결정의 형성을 근본적으로 피할 수 있는 유리화 동결법을 검토하였다. 이 방법은 세포를 급속히 동결시키고, 동결 용액의 점성을 증가시켜 세포 내·외의 유리수가 비결정형으로 유지되는 동결법(Hey et al., 1996)이다. 특히, 유리화 동결은 조작이 간단하고, 고가의 장비가 필요 없기 때문에 경제적으로 유익하다는 점이며, 앞에서 언급한 것과 같이 얼음 결정이 원천적으로 형성되지 않아, 상해를 최소화 할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서 유리화 동결 시, 동결 보호제로 EG를 각각 0%(대조군), 2.5%, 5%, 10%, 15%의 비교적 낮은 농도를 사용했고, 특히 10% EG + 15% FBS 조합의 처리군의 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율이 가장 높았다. 이는 동결 방법에 따라서 세포 내의 유리수를 침투성 동결 보호제와 교체하도록 유도한 다음, 천천히 냉각시켜 일정 온도에 도달한 후 세포질 내에 얼음 결정이 형성되지 않도록 외부에 식빙을 하고 충분히 낮은 온도에 도달하면 보존하는 완만 동결법은 2.0 M의 저농도의 동결 보호제 (Bautista<sup>a</sup> et al, 1998)를 사용한 결과와 유사한 경향을 보인다. 또한 Rall et al.(1987)은 본 실험과 동일한 방법인 마우스의 배아의 유리화 동결 연구에서 유리화 동결 용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 동결 및 융해의 과정에서 얼음 결정화(Miyake et al, 1993; Gardner et al, 2000)가 일어나 세포에 손상을 주기 때문에 이런 결정화가 일어나지 않도록 투과력이 높은 고



농도의 동결 보호제를 사용했다고 보고하고 있다. 실험동물 중에서 가장 많이 이용되는 대표적인 포유류인 마우스의 배아와 조류인 닭 원시 생식 세포의 유리화 동결 연구 결과를 직접적으로 비교하는 것은 불가능하다. 하지만, 차후에 닭 원시 생식 세포 동결 보호제의 종류와 처리 시간을 조절하여 세포 독성을 줄이는 방법의 확립과 이를 통해 닭 원시 생식 세포 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 원시 생식 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결 및 융해 후, 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고, 가장 광범위하게 사용되고 있는 세포 동결 보호제로 알려져 있지만, 본 연구에서 닭 원시 생식 세포의 유리화 동결 용액과 동결 용기의 선택과 조합에 따라서 DMSO 뿐만 아니라, 동결 보호제로써 10% 농도의 EG도 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한 이번 실험 결과들로부터 닭 원시 생식 세포를 유전 자원으로 영구 보존하기 위하여 동결용 플라스틱 스트로와 병행해서 동결용 튜브 모두 이용할 수 있음이 시사되었으며, 자동 세포 동결기(programmed freezer)와 같은 고가의 장비 없이도 경제적으로 유익하고 조작이 간단한 유리화 동결 방법이 닭 원시 생식 세포동결 보존의 효율성을 증진시킬 것으로 기대된다. 만약, 동결된 닭 원시 생식 세포를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존율과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면, 동결 닭 원시 생식 세포의 생식계열 키메라를 이용한 한국 재래닭인 오계를 필두로 멸실 위기의 계통과 개체의 복원이 실용화 될 가능성이 높아 지게 된다. 그러므로 닭 원시 생식 세포의 동결 보존 기술 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존 세포를 확보하는 방안과 닭 원시 생식 세포 동결 보존 기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

### 적 요

동결 닭 원시 생식 세포의 생식계열 키메라를 이용한 생체에의 복원을 실용화 하기 위해서는, 닭 원시 생식 세포의 동결 보존 기술의 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존 세포를 확보하는 것이 반드시 필요하다. 닭 원시 생식 세포는 배양 5.5일령의 닭 원시 생식선으로부터 채취하고, MACS 방법에 의해서 순수 닭 원시 생식 세포를 분리했다. 15% 각 각의 EG를 동결 보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에

상관없이 유의적( $p<0.05$ )으로 PG 처리군보다 동결 및 융해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히, 동결 보호제로 10% EG를 이용한 유리화 처리군에서 85.63%로 동일한 농도의 PG 처리군(66.81%)보다 유의적( $p<0.05$ )으로 가장 높은 생존율을 보였다. 한편, 10% EG를 이용한 완만 동결 처리군에서 66.14%로 동일한 농도의 PG 처리군(50.11%)보다 유의적( $p<0.05$ )으로 가장 높은 생존율을 보였다. 이상의 결과들로부터 유리화 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 최적의 동결 보호제로서 사용 가능함을 확인하였고, 이는 한국재래닭(오계)의 원시 생식 세포의 동결 보존의 실용화가 보다 더 향상될 수 있는 또 하나의 방법이 될 수 있음을 시사한다.

(색인어 : 원시 생식 세포, 유리화 동결법, 완만 동결법, 생존율, 오계)

### 사 사

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

### REFERENCES

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.

Blackburn, HD 2006 The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. Poult Sci 85:210-215.

Bautista<sup>a</sup> 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.

Bautista<sup>b</sup> JA, Kanagawa H 1988 Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Jpn J Vet Res 45:183-191.

Boutron P 1984 A more accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: Comparison with equilibrium. Cryobiology 21:183-191.

Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS and Chung KS 2002 Cryopreservation of human embryos using ethylene

- glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod* 17:2146-2151.
- Fulton JE and Delany ME 2003 Poultry genetic resources-operation rescue needed. *Science* 300:1667-1668.
- 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, M Lane 2000 Embryo culture systems. In "Handbook of *In Vitro* Fertilization", 2<sup>nd</sup> 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.
- 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.
- IUCN Red List 2012 URL [http://www.iucnredlist.org/documents/ Summarystatistics](http://www.iucnredlist.org/documents/Summarystatistics)
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T 1992 High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 46:1042-1046.
- Kasai M, Ito M, Edashige K 2002 Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 17:1863-1874.
- 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. *J Animal Reprod* 20:119-126.
- Kino K, Pain B, Leibo SP, Clark ME, Etches RJ 1997 Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry Sci* 76:753-760.
- Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H 2005 Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 11:663-673.
- Kroll G 2001 The "Silent springs" of Rachel Carson; Mass media and the origins of modern environmentalism. *Public Underst Sci* 4:403-20.
- Kuleshova LL<sup>a</sup>, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM 1999 Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38:119-30.
- Kuleshova LL<sup>b</sup>, 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.
- 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 ultrarapid cooling. *Biol Reprod* 54:1059-1069.
- 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.
- Mozdziaik PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, 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, Kuwana T 1994 Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J Reprod* 102:321-325.
- Naito M 2003 Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *J Poultry Sci* 40:1-12.
- Petite JN 2006 Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells. *Poultry Sci* 85:237-242.

- 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 1987 Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Rayos AA, Takahashi YM, Hishinuma, Kanagawa H 1994 Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil* 24: 100-123.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T 1992 A method to obtain germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 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, Otoge H, Sakurai T, Machida T 1993 Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 98:139-145.
- (접수: 2014. 9. 24, 수정: 2014. 10. 28, 채택: 2014. 11. 11)