

## 간이 동결 방법이 닭 원시 생식 세포의 생존율에 미치는 영향

김 현<sup>1</sup> · 조영무<sup>1</sup> · 한재용<sup>2</sup> · 최성복<sup>1</sup> · 조창연<sup>1</sup> · 서상원<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 Effect of Simple Freezing Method on Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cells on the Chicken

Hyun Kim<sup>1</sup>, Young Moo Cho<sup>1</sup>, Jae Yong Han<sup>2</sup>, Sung Bok Choi<sup>1</sup>, Chang-Yeon Cho<sup>1</sup>, Sangwon Suh<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 151-742, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted to establish the method for preserving chicken primordial germ cells (PGCs) that enables long-term storage in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for developmental engineering or preservation of species. The purpose of this study is to clarify the effects of simple freeze-thaw treatment on viability of PGCs in chickens and to the optimal protocol for PGCs freezing. PGCs obtained from the germinal gonade of an early embryos of 5.5~6 day (stage 28) of Isa Brown, Korean Ogye (KO), White Leghorn and Commercial breeds, 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)). 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 simple freezing, with different concentrations of the cryoprotectant solution, were examined. After simple freezing, the viability of PGCs after freeze-thawing was significantly higher for Commercial breeds (88.7±2.4%) than KO (85.1±0.4%), Isa Brown (84.6±0.2%) and White Leghorn (85.9±0.1%) ( $p<0.05$ ) using 10% EG cryoprotectant. Therefore, these systems may contribute in the improvement of cryopreservation for a scarce species in birds preservation. 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 database. (Key words : primordial germ cells (PGCs), simple freezing, cryoprotective agents, viability, chicken breed)

## 서 론

사람을 포함한 척추동물 종의 개수가 64,283개인데, 그 중에서 조류가 10,064개 비율로 가장 많이 차지한다(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN))고 2012년도 보고서에 제시를 했다(IUCN, 2012). 이와 같이 조류 종의 중요한 특징 중의 하나는 유전적인 다양성이 상당히 높다는 것이다. 하지만, 놀랍게도 1996년과 1998년 두 차례 조류 종의 개체 수를 조사한 이래 2012년에 약 13.0%에 해당하는 1,313종이 멸종위험에 처한 것으로 분류되어 보고되었다(IUCN, 2012). 이는 이미 가금류를 중에 일부가 멸종 위험에 처해 있고(Fulton & Delany, 2003), Black-

burn(2006)은 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)와 같은 치명적이고 잠재적인 전염병 등으로부터 가금산업 전반적으로 위기에 직면해 있다고 보고했다. 가축유전자원의 보존 및 관리는 여러 국제기구에서 쟁점화 되고 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 다양성과 함께 개체의 다양성이 전제되어야 한다.

한편, 진화론적인 관점으로부터, 유전적인 다양성의 발견 및 보존이 얼마나 중요한지를 살펴보면 약 1억 5천만 년 전에 존재한 것으로 여겨지는 시조새인 아르카이오테릭스 (*Archaeopteryx lithographica*)는 von Meyer(1861, 1862)가 독

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

일에서 화석을 최초로 발견을 하였고, Huxley(1868)가 형태학적인 유사성 때문에 새와 공룡 간의 차이점을 밝혔다고 주장을 했다. 또한 최근에 Tamura 연구팀은 조류가 공룡으로부터 진화했다고 학술지에 발표를 하기도 했다(Tamura et al., 2011). 조류 유전자원의 손실은 특히, 공룡과 같은 선조 동물 사이를 연결하는 고리가 단절되는 것과 같은 것을 의미한다. 이와 같이 연구 및 학술적으로 조류 생명자원(avian bioresources)의 가치는 매우 중요하다. 한반도에서 약 2,000년 전부터 한반도에서 다른 품종과 섞임이 없이 순수 혈통을 유지하여 온 한국재래닭의 품종은 생물 다양성 협약에 의한 자국의 종자 확보 및 보호 측면에서 국가 간 경쟁이 심화되는 국제 추세로 보아, 부존자원이 부족한 우리나라의 중요한 유전자원으로 가치가 있다.

현재, 고병원성 조류인플루엔자(HPAI) 등의 심각한 인수 공통전염병에 대비하여, 한국재래종을 시작으로 해서 희귀한 지역 특산 닭 상업적으로 매우 중요한 실용계를 생산하는 종계의 유전자원을 완전한 형태로 장기보존 방법을 연구한 결과, 초기 배자 유래 세포의 동결 방법이 대안으로 제시되었다. 유전자원으로 세포동결 보존에는 다분화 능력을 가진 배반엽 세포를 이용하는 방법(Watanabe et al., 1992)과 조류뿐만 아니라 포유류에도 존재하여 성세포로 분화 가능한 능력을 보유하고 있어, 정소에서는 정원 세포(spermatogonia) 혹은 난소에서는 난원세포(oogonia)로 분화하는 능력을 가진 세포인 원시 생식 세포(Primordial germ cells : 이하 PGCs)를 이용하는 방법들이 있다. 이 두 방법 모두 다 보존 세포를 완전한 개체로 복원하기 위해서는, 보존 세포를 다른 수여자 배자에 이식하는 기술이 필요하며, 우선 생식계열 키메라(germline chimera) 개체를 형성한 후에 생식계열 키메라 간의 교배 또는 암컷 키메라에 동결정액을 인공 수정하는 방법으로 완전한 유전자원을 복원할 수 있다(Kino et al., 1997; Han et al., 2002; Naito et al., 2003; Petite et al., 2006). Naito 등(1994)은 최초로, 동결 보존된 닭 PGCs를 이식해서 생식선 키메라를 제작하였다. Tajima 등(1998)은 또한, 발생 5일째 배자부터 동결 보존된 닭 원시 생식선유래 닭 PGCs를 이용하여 생식선 유래 키메라를 제작하였다. 이러한 연구들 모두는 완만 동결(slow-freezing)법을 사용하였다(Naito et al., 1994; Tajima et al., 1998). 그러므로 조류 유전자원의 복원은 세포 동결 보존에 의하여 양쪽의 성염색체를 동시에 영구 보존할 수 있는 유일한 기술이라고 할 수 있으나, 아직까지 많은 기술적 어려움이 존재한다.

동결 보존의 기본 원리는 세포의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결 보호제(cryoprotectant)의 삼

투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음 결정(icecrystal)을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다(Yoon et al., 2007). 동결 방법으로는 낮은 동결 보호제의 농도와 완만한 냉각 속도(cooling speed)를 이용하여 세포 내의 수분을 서서히 탈수시키면서 동결하는 완만 동결(slowcooling method)과 고농도의 동결 보호제와 초고속 냉각 속도를 사용하는 유리화 동결(vitrification)이 널리 사용되고 있다. 동결 보존 후 원시 생식 세포의 생존율에 있어서 동결 방법만 큼이나 중요한 것은 동결-융해 과정 중 사용되는 동결 보호제(cryoprotective agents : CPAs)의 종류, 농도 및 처리 시간이다(Friedler et al., 1988; Mandelbaum et al., 1988; Dumoulin et al., 1994; Nowshari et al., 1995). 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동결 보호제로서 DMSO, glycerol 그리고 propandiol(1,2-PROH)를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등(1996)은 소 성숙 난자를 ethylene glycol을 사용하여 높은 배반포 발생효율을 보고한 것과 같이 ethylene glycol을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동결 보호제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 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, 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.

생식계열 키메라를 활용한 조류 유전자원의 복원을 위하여 닭 PGCs의 동결 보존 기술의 향상은 동결 및 융해 후 생존 세포를 최대한 많이 확보하는 기술로서 생식계열 키메라 생산에 근간을 차지하고 있다. 그러나 실험과정에서 닭 PGCs의 회수, 정제 및 조작에 여러 가지 어려움이 있으며, 한 개의 배아에서 약 30개 정도의 제한된 숫자만 얻을 수 있다는 점은 더욱 연구를 어렵게 만들고 있다(Yasuda et al., 1992). 더욱이 닭 PGCs의 배양체계는 아직까지 완전하게 확립되어 있지 않은 영역이라, 성공적인 닭 PGCs의 동결 보존은 유전자원 보존으로서 필수적인 기술로 추정된다. 일반적으로 닭 PGCs의 정제 방법과 이식 방법에 의한 생식 계열 키메라 제작에 관한 연구 결과를 많은 연구자들이 보고(Natio et al., 1994; Kino et al., 1997; Han et al., 2002; Petite et al., 2006)하고 있으나, 닭 PGCs의 동결 방법에 관한 직접적인 비교 및 검토는 미진하다고 판단되었기에, 본 연구에서 닭 PGCs의 동결 효율성을 증진시키는 방법에 관한 연구를 실시하였다. 특히, 닭 PGCs의 유리화 동결 방법과 완만 동결의 비교 검토로 동결 보존 기술이 증진된다면, 조류의 유전자원 보존

의 복원과 함께 형질전환 닭의 보존 방법에 관한 효율성이 증진될 것으로 판단된다. 우선, 본 연구에서는 동결 보존 기술의 개선에 의한 한국 재래닭 PGCs의 동결 및 융해 후의 생존율을 높이기 위해서, 오계 PGCs의 동결 및 융해 후의 생존율을 검토하였으며, 동결 방법의 개선을 목적으로 간이 동결법을 이용한 닭 품종 간의 원시 생식 세포의 동결 성적을 비교 및 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 재료 및 시험계의 사양 관리

본 실험에 사용된 공시계는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국재래닭 3원 교잡종과 가축유전자원시험장에서 보유하고 있는 44주령의 한국재래닭 오계(KO), 화이트레그혼(WL), 이사 브라운(IB)의 수탉에서 정액을 각각 채취하고, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13°C, 습도 70~85%의 종란 보관용 배양기에서 보관한 뒤 부화기에 입란하고, 5.5~6일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 한국가금사양표준의 NRC 사양표준에 준한 시판 종계 사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 그리고 남원시 소재의 일반양계농가의 44~46 주령의 한국육종협회3호종(상업용 닭 : C)의 수정란을 공급받아서 시험에 공시했다. 또한, 모든 공시계는 국립축산과학원의 실험동물 사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시되었다.

### 2. 실험군 설계

동결 배지의 기초가 되는 혈청으로서 소태아 혈청(FBS)을 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 그리고 동결 방법은 스티로폼 박스를 이용한 간이 동결법을 이용하고, 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포 생존율 측정은 0.4% Trypan blue 염색법(Freshney, 2005)을 이용해 서로 비교 검토하였다.

#### 1) 실험 1 : 동결 배지의 농도별 효율

닭의 원시 생식 세포를 동결할 때의 동결 배지의 기초가 되는 혈청으로 15% FBS를 기본으로 하고, 동결 보호제는 DMSO, EG 그리고 PG의 농도를 0(대조군), 2.5, 5, 10 그리

고 15%로 되게 조정된 실험구를 설정한 후 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포의 생존율을 통해 동결 배지의 농도별 최적의 효율을 비교 및 검토하였다.

#### 2) 실험 2 : 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 튜브를 각각 이용해, 동결 및 융해 후의 원시 생식 세포 생존율을 통해 동결 용기별 최적의 효율을 비교 및 검토하였다.

#### 3) 실험 3 : EG, DMSO, PG의 동결 효율 비교

실험 1에서 최적의 농도별 효율을 확인한 후, 한국재래닭인 오계와 화이트레그혼종, 이사 브라운종 그리고 상업용으로 육종화된 한국육종협회3호종 네 품종 간의 동결 및 융해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율을 각각 확인했다.

### 3. PGCs의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 사육 중인 실험 축을 사용하여 Hamburger and Hamilton(1951)의 배 발달 단계에 기초하여, 37.8°C, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 발생 초기 배자로부터 원시 생식선의 분리 방법은 5.5일(stage 28(Hamburger and Hamilton, 1951))동안 발생한 초기 배자를  $Mg^{2+}$ 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 원시 생식선 부분만을 분리한 후, MACS 법에 의해 분리 및 순수 정제를 하기 위해, 이를 1.5 mL 튜브에 수집하여 실온에 두었다.

### 4. MACS 법에 의한 분리 및 정제

Park 등의 실험 방법을 조금 응용하여, 원시 생식선은 0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 함유된 0.05%(v : v) trypsin 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 1.5 mL 원심 분리 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  $\mu$ m 격자 크기의 망 구조 필터(BD falcon, Cell Strainer, USA)를 이용하여 필터를 하고, 200 g

에 5분간 원심 분리를 했다. MiniMACS(magnetic-activated cell sorting) system(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용해서 원시 생식선 유래의 닭 PGCs(gPGCs)를 순수 분리 및 정제하였다(Kim et al., 2004). 원심분리 후, 생식선 세포(한 개의 tube당  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ )는 SSEA-1 항체를 이용하여 MACS 방법으로 순수 gPGCs를 정제하였다. 닭 생식선 유래 세포 혼합물을 PGC-specific antibody로 알려진 anti-stage specific embryo antigen(anti-SSEA)-1 antibody(Santa Cruz Biotechnology, mouse IgM isotype: SSEA-1, MC-480)를 5% NGS/PBS에 1:200으로 희석하여 실온 20~25°C에서 20분간 반응을 시켰다. PBS에 0.5% BSA와 2 mM EDTA가 함유된 1 mL MACS buffer로 세정을 하고, 200 g에 5분간 원심 분리 수행한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 아래에 침전된 세포괴를 rat anti-mouse IgM microbeads 20  $\mu$ L가 포함된 100  $\mu$ L MACS buffer와 천천히 혼합하여 4°C에 15분간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500  $\mu$ L buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정을 한 후 MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다(Kim et al., 2004).

#### 5. PGCs의 동결 및 용해 후의 생존율 측정

동결 보호제의 동결과 용해의 기본 용액은 0.5% 소혈청 알부민(Sigma)을 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Sigma)를 사용하였다. 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 용해를 실시하였다. 0.25 mL 및 0.5 mL 동결용 플라스틱 스트로, 동결용 튜브에 4°C 조건을 유지하면서 300  $\mu$ L의 동결 배지에 원시 생식 세포 10~40개를 주입하고, 4~5분간 평형을 유지한다. 간이 동결 용기로 아이스박스 내부 규격 27.5×42×17.5 cm의 크기에 액체 질소를 5 cm, 액체질소 표면 상층 4~4.5 cm 위치에 플라스틱 지지체를 부착하고 약 10분에서 15분간 방치한 후, 가능한 30~40초가 넘지 않도록 빨리 액체질소(LN<sub>2</sub>)에 침지하였으며, 동결용 튜브에 넣은 후 액체질소(LN<sub>2</sub>)통에 옮기기까지 1분 30초~2분을 초과하지 않았다. 최소한 1~2달 후에 액체질소(LN<sub>2</sub>) 탱크로부터 동결 보존된 동결용 튜브를 꺼내어 공기 중에서 약 5초간 상온에 유지하고, 37°C 온탕에 3분간 침지하여 용해를 실시하였다. 세포를 부유시켜 15 mL 원심 분리용 시험관으로 옮겨서 DMSO, EG 및 PG의 희석 제거를 위해서 15% FBS+DMEM를 30초간격으로 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L 그리고 8 mL를 넣고 각각 240 g에서 6분간 원심 분리를 하여 상층액과 함께 동결 보호제를 제거하였다. 세포는 125  $\mu$ L의 10%

FBS+DMEM에 부유시켜, CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 38°C)에서 3시간 배양한 후에 20  $\mu$ L를 취한 후 0.4% trypan blue로 염색하여 trypan blue exclusion 방법에 의거하여 생존율을 검토하였으며(Freshney, 2005), 모든 간이 동결 실험은 8회에 걸친 반복테스트를 실시하였다.

#### 6. 통계 분석

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

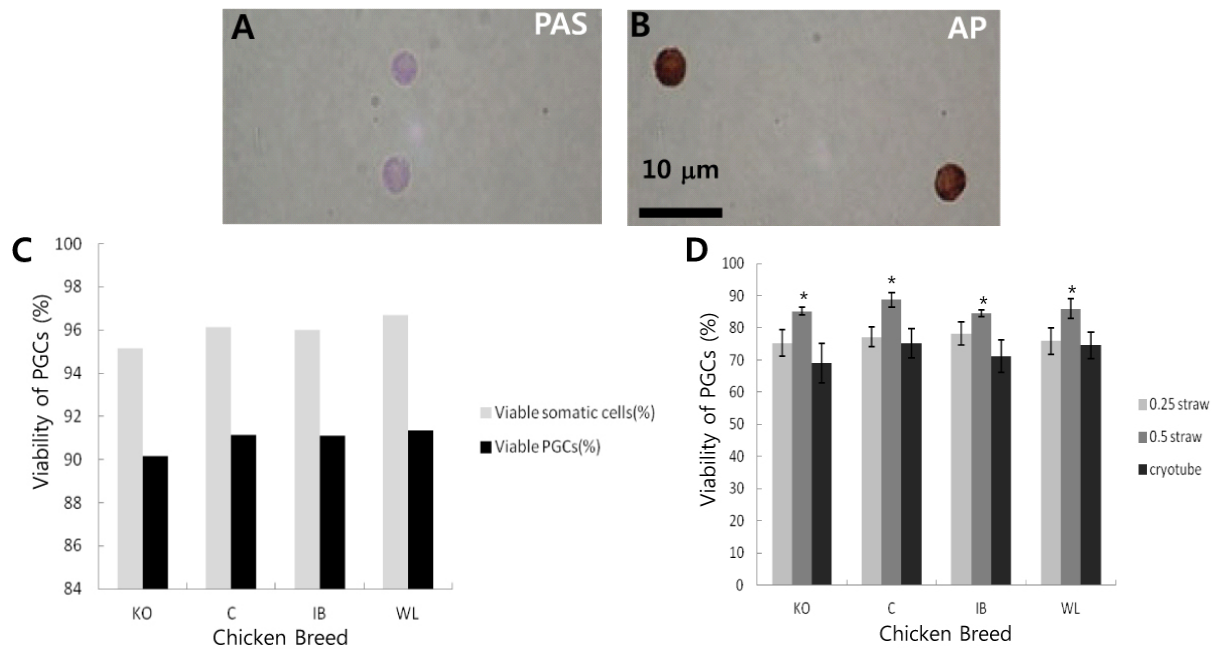
## 결 과

### 1. MACS 정제 전, 후의 품종 간의 원시 생식 세포 생존율 비교 분석

동결 보존용기로 동결용 플라스틱 스트로(0.25, 0.5 mL) 및 동결용 튜브를 이용, 간이 동결 방법을 이용한 동결 및 용해 후의 닭 원시 생식 세포의 세포 생존율을 확인하기 위하여 먼저 초기 배자의 발생 stages 28단계에서 채취한 닭 원시 생식 세포를 MACS 방법을 이용한 순수 분리 및 정제 전-후의 닭 원시 생식 세포의 형태학적인 특징을 Alkaline phosphatase(AP)와 Periodic acid-Schiff Staining(PAS)를 염색한 결과를 각각 Fig. 1 (A), (B)에 나타내었다. 그리고 순수 분리 정제 효율을 Fig. 1 (D)에 각각 나타내었다. 닭 원시 생식 세포의 동결 및 용해 후의 원시 생식 세포의 순도는 MACS 정제 전, 살아있는 체세포의 비율이 이사 브라운종(96.0%), 오계종(95.14%), 한국육종협회3호종(96.15%) 그리고 화이트 레그혼종(96.70%)임을 확인하였다. MACS 정제 후의 닭 원시 생식 세포의 생존비율은 아사 브라운종(91.11%), 오계종(90.16%), 한국육종협회3호종(96.16%) 그리고 화이트 레그혼종(91.36%)의 순수 정제율을 각각 나타내었다. 상업용 닭으로 개량된 한국육종협회3호종에서 PGCs의 정제율이 가장 높았으나, 네 품종 간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 네 품종에 관계없이 평균 90.94%의 정제효율을 확인했다.

### 2. 동결 보존 용기가 품종 간의 원시 생식 세포의 동결 및 용해 후 생존율에 미치는 영향

동결 보존 용기에 따른 간이 동결 및 용해 후의 원시 생식 세포의 세포 생존의 비교를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저, 한국 재래닭(오계) 품종의 경우, 0.25 mL 동결 용 플라스틱 스트로 사용 시, 75.31% 그리고 직경이 두 배 큰 0.5 mL의 사용 시, 85.11%의 유의적으로 더 높은 원시 생식 세포의



**Fig. 1.** (A) and (B) : Morphological characteristics of PGCs and Periodic acid-Schiff (PAS) and alkaline phosphatase (AKP) stained PGC after cryopreservation. (C) : Efficient purity of PGCs from germinal gonad of IB, KO, C and WL chicken embryos by MACS purification. The purity is the ratio of PGCs in the total cell population. In 8 repeated experiments on 5.5-day-old embryos, the average purity of PGCs±S.D. was obtained. (D) : Comparison of survival rates of vitrified-thawed PGCs according to the freezing vessel. Each column represents the mean±S.E. (n=8), \*  $p<0.05$ . EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, PG : propylene glycol, PGCs : primordial germ cells, MACS : magnetic-activated cell sorting. The scale bar means 10  $\mu$ m. IB : Isa Brown, KO : Korean Oge, C : Commerical chicken, WL : White Leghorn.

세포 생존률을 보였다. 동결용 튜브 처리군의 경우, 원시 생식 세포의 세포 생존률이 69.12%로 동결용 플라스틱 스트로 처리군과 비교해서 낮음을 확인하였고, 본 연구에서의 간이 동결 및 용해 실험을 수행하는데 있어서 가장 효율적인 동결 용기는 0.5 mL 동결용 플라스틱 스트로임을 확인하였다. 또한, 한국 재래닭으로 잘 알려져 있는 오계를 필두로 네 품종 간의 간이 동결 및 용해 후의 사용 동결 용기별 원시 생식 세포의 생존률은 비슷한 경향을 보였고, 네 품종 간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

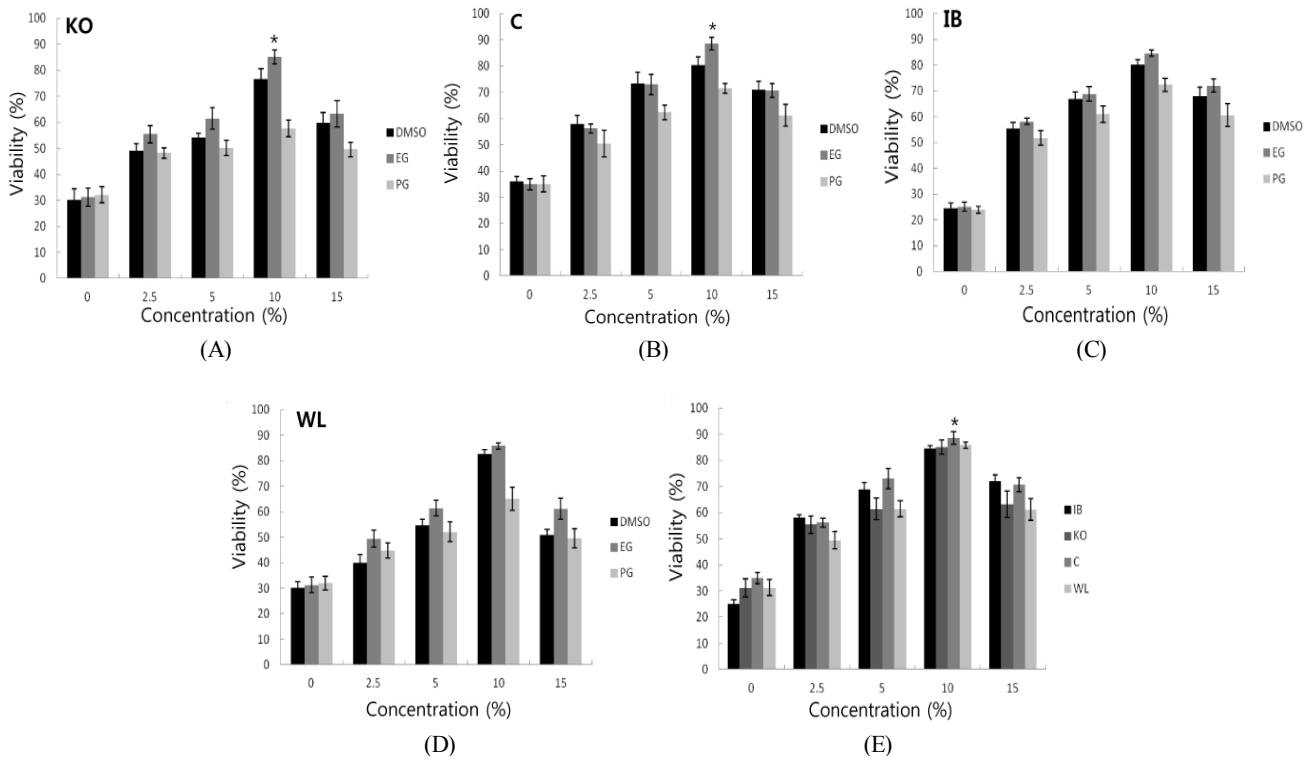
### 3. 동결 배지의 농도별 효율 및 동결 보호제에 따른 원시 생식 세포 생존율 비교 분석

동결 시, 용액 중의 동결 보호제 EG, DMSO 그리고 PG 첨가에 의한 동결 배지의 각각의 농도별 동결 및 용해 후의 오계(A), 한협육종협회3호종(B), 아사 브라운(C) 그리고 화이트 레그혼(D)의 네 품종 각각의 원시 생식 세포의 생존효율을 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 10% DMSO, EG 그리고 PG의 처리구가 나머지 2.5%, 5%, 15%의 처리구보다 원시 생식 세포의 생존율이 네 품종에 상관없이 높음을

확인했다. 또한, 네 품종에 있어 동결 보호제 10% EG와 10% DMSO 처리구 간에는 유의적( $p<0.05$ )인 차이는 보이지 않았지만, 10% PG 처리구에 비해 세포생존율이 유의적( $p<0.05$ )으로 높음을 확인했다. 특히, 10% EG+FBS 조합의 처리군에서 상업용 닭인 한협육종협회3호종(B : 88.7%)이 오계종(A : 85.1%), 아사 브라운종(C : 84.6%) 그리고 화이트 레그혼종(D : 85.9%)의 세 품종보다 동결 및 용해 후의 닭 원시 생식 세포의 생존율이 유의적( $p<0.05$ )으로 높음을 Fig. 2 (E)에서 확인하였다.

## 고 찰

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. 가축유전자원으로서 세포은행 구축을 위한 기반 기술로 이용되고 있는 동결 기술은 재생의학과 조직공학



**Fig. 2.** The viability of PGCs after freeze-thaw following treatment with various combinations of cryoprotectant (EG, DMSO and PG) among Chicken Breed. (D) : Percentage of PGCs that is viable by cryoprotectant EG treatment. Concentration (%) means the concentration of cryoprotectant (EG, DMSO and PG).

Each column indicates the means $\pm$ S.E. standard error (S.E.) (n=8). \*  $P < 0.05$  (compared with Control). IB : Isa Brown, KO : Korean Oge, C : Commerical chicken, WL : White Leghorn, EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide, PG : propylene glycol.

에서의 임상적 적용을 위한 세포의 중요한 기술로 이용될 가능성이 높다. 특히, 닭 PGCs의 경우, 제한된 세포 공급 때문에 세포은행에서 장기간 저장의 중요성은 더욱 더 강조되어 왔다. 만약, 동결된 닭 PGCs를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존율과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면, 동결 닭 PGCs의 생식계열 키메라를 이용한 멸실 위기의 계통과 개체의 복원이 실용화 될 가능성이 높아지게 된다. 따라서 원시 생식 세포의 동결 및 융해 기술은 멸종위기의 희귀동물이나 경제적 가치가 큰 동물의 생식 세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다. 그러므로 원시 생식 세포의 대량 확보 수단으로서의 원시 생식 세포의 동결 보존 기술 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 그러므로 닭 PGCs의 동결에 관한 기초 자료를 얻기 위하여 본 연구는 생식계열 키메라 제작에 앞서, 먼저 오계를 필두로 이사 브라운종, 화이트 레그혼종 그리고 상업용 닭의 네 품종의 닭 PGCs 간이 동결 방법에 의한 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율의 향상에 초점을 맞추고, 혈청이 미치는 영향에 대해서 비교 및 검토하였다.

닭 PGCs의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고, 더불어 수분 함유량이 비교적 많아, 이를 효과적으로 동결 보존하기 위해서는 특히, 얼음 결정의 형성 (Sutton et al., 1991; Gardner et al., 2000)을 근본적으로 피할 수 있는 유리화 동결법을 검토하였다. 이 방법은 세포를 급속히 동결시키고, 동결 용액의 점성을 증가시켜 세포 내·외의 유리수가 비결정형으로 유지되는 동결법(Hey and MarFarlane, 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. 하지만, 유리화 동결 용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 동결 및 융해의 과정에서 얼음 결정화(Miyake et al., 1993; Gardner et al., 2000)가 일어나, 세포에 심각한 손상을 주는 단점이 있다. 본 연구 결과와 비교해 Kim 등(2013)은 닭 PGCs의 유리화 동결 연구에서 이러한 얼음 결정화가 일어나지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결 보호제를 사용했다고 보고하고 있다.

일반적으로 동결 보호제의 역할은 동결 시 생기는 얼음 결정 및 고농도 용매에 의한 세포 손상을 막는 것이다. 동결 보호제로 많이 사용되어온 EG, DMSO 그리고 PG 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 침투성 동결 보호제(permeable cpa)와 당(sugars) 또는 polyvinylpyrrolidone(PVP), 혈청알부민(serum albumin), 혈청(serum), polyethylene glycol(PEG), ficoll 등과 같은 거대 분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비침투성 동결 보호제(non-permeable cpa)로 구분된다(Love-lock et al., 1959; Boutron et al., 1984). 본 연구에서는 투과성(EG, DMSO, PG) 및 비 투과성 억제제인 혈청알부민(serum albumin), 혈청(serum)을 가지고, 간이 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율에 관한 검토를 실시하였다. 그 결과, Kim 등(2013)이 유리화 방법을 이용해 닭 원시 생식 세포를 동결 및 융해 후의 생존율 비교 연구의 결과와 유사했다. 즉, 간이 동결 시, 동결 보호제로 EG, DMSO 그리고 PG를 각각 0 (대조군), 2.5, 5, 10, 15%의 비교적 낮은 농도를 사용했고, 특히 10% EG+15% FBS 조합의 처리군의 융해 후의 닭 PGCs의 생존율이 가장 높았다. 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 PGCs에 미치는 손상을 최소화 했을 가능성이 사료된다. 이는 Meryman 등(2007)이 동결 속도, 삼투압에 의한 세포 손상 그리고 세포와 동결 보호제의 조합이 세포 동결 시에 중요한 요소라고 보고했는데, 닭 PGCs의 간이 동결 과정에서 10% EG+15% FBS 조합의 처리군이 삼투압에 의한 세포 손상이 감소되었을 가능성이 생각된다. 실험동물 중에서 가장 많이 이용되는 대표적인 포유류인 마우스의 배아와 조류인 닭 PGCs의 유리화 동결 연구 결과를 직접적으로 서로 비교 및 해석하는 것은 불가능하다. 하지만, 차후에 닭 PGCs 동결 보호제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포 독성을 줄이는 방법의 확립과 이를 통해 닭 PGCs 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 PGCs에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결 및 융해 후, 동결 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고, 지금

까지 닭 PGCs 동결 시에 동결 보호제로서 일반적으로 가장 광범위하게 사용(Naito et al., 1994; Tajima et al., 1998, 2003, 2004)되고 있는 세포 동결 보호제로 알려져 있지만, 흥미롭게도 최근에 Kobayashi 등(2003)은 DMSO보다 항동해제로서 EG 사용했을 때 동결 및 융해 후의 PGCs 생존율(73%)이 더 우수하다고 보고했는데, 본 연구의 결과와도 일치함을 알 수 있었다. 이는 FBS 중의 극소량 성분이 동결 전 그리고 융해 후의 세포들에게 있어선 영양 첨가 인자로써의 기능을 할 가능성이 존재한다. 이런 결과들로부터 FBS의 첨가는, 융해 후의 닭 PGCs 생존율을 크게 향상시키는데 유효할 가능성이 높다고 추정된다. 또한 동결 보호제로서는 10% DMSO보다 10% EG를 기초 배지에 첨가해서 사용하는 방법은 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율을 높일 수 있을 것이라 사료된다. 또한 이번 실험 결과들로부터 닭 PGCs를 유전자 원으로 영구 보존하기 위하여 0.5 mL 동결용 플라스틱 스트로 사용 시, 동결용 튜브보다 동결 및 융해 후의 세포 생존성이 유의적( $p<0.05$ )으로 높은 수치를 나타내었다. 이는 동일한 10% 농도의 EG를 동결 보호제로 이용할 경우, 동결용 튜브보다 동결용 플라스틱 스트로의 벽이 더 얇기 때문에 온도 변화가 신속하게 전달되며, 세포에 대하여 정확한 온도 조절로 부하의 손상이 작을 것으로 생각된다. 본 연구에서 이용된 닭 PGCs의 간이 동결 결과와 직접적인 비교는 힘들지만, Kim 등(2013)은 유리화 동결에 있어 동결용 플라스틱 스트로보다 동결용 튜브의 사용 시, 유의적( $p<0.05$ )으로 더 높은 생존율을 보였다고 보고했다. 본 연구의 결과와 상반되는 결과로, 이는 오히려 동결용 플라스틱 스트로 용기의 얇은 벽에 의하여 닭 PGCs의 동결 과정과 동결 후 보존 과정 및 융해 시의 온도 변화에 따른 충격 등과 같은 환경적인 요인 등으로 인하여 닭 PGCs가 많은 손상을 입었을 가능성도 배제할 수가 없다.

자동 세포 동결기(programmed freezer)와 같은 고가의 장비 없이도 경제적으로 유익하고 조작이 간단한 유리화 동결 방법(Kim et al., 2013)과 더불어 스티로폼 박스를 이용한 간이 동결법이 닭 PGCs 동결 보존의 효율성을 증진시킬 수 있는 하나의 요인으로 기대된다. 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(Saha et al., 1996; Kuleshova et al., 1999, 2001; Kasai et al., 2002; Lee et al., 2009). 최근에 열전도율을 증진시키는 방법 중 하나인 반고체 상태인 슬러시 상태의 질소(slushtnitrogen, SN<sub>2</sub>)를 사용하여 난자와 배아의 유리화 동결 후 생존율과

배아 발생의 증진을 보고한 연구도 있다(Arav et al., 2002; Yavin et al., 2009; Yoon et al., 2007). 하지만, 닭 PGCs에서는 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.

만약, 동결된 닭 PGCs를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존율과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면, 동결 닭 PGCs의 생식계열 키메라를 이용한 한국 재래닭인 오계를 필두로 멸실 위기의 계통과 개체의 복원이 실용화 될 가능성이 높아지게 된다. 향후, 닭 PGCs의 동결 보존은 형질전환 닭의 생산에 있어서 닭 PGCs의 유전자 도입 실험의 설계를 용이하게 계획하기 위하여 필수적인 기술로 추정되고, 기존의 생산된 형질전환 닭의 유전자원 보존을 위하여 형질전환 개체의 후대 종란의 PGCs를 보존하는 방안에서도 이용될 가능성이 높다.

## 적 요

동결 닭 PGCs의 생식계열 키메라를 이용한 생체외의 복원을 실용화 하기 위해서는, 닭 PGCs의 동결 보존 기술의 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존 세포를 확보하는 것과, 생식계열 키메라의 제작 효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 닭 PGCs는 배양 5.5~6일령의 닭 원시 생식선으로부터 채취하고, MACS 방법에 의해서 순수 닭 PGCs를 분리했다. 15% 각각의 EG와 DMSO를 동결 보호제로 사용한 처리군이 각 군의 농도에 상관없이 유의적( $p<0.05$ )으로 PG 처리군보다 동결 및 융해 후의 세포의 생존율이 높음을 확인하였다. 특히, 10% EG+FBS 조합의 처리군에서 상업용 닭인 한협육종협회3호종(B : 88.7%)이 오계종(A : 85.1%), 아사 브라운종(C : 84.6%) 그리고 화이트 레그혼종(D : 85.9%)의 세 품종보다 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율이 유의적( $p<0.05$ )으로 높음을 확인하였다. 간이 동결에 있어서 가장 높은 생존율을 보인 10% EG이 10% DMSO와 함께 최적의 동결 보호제로서 사용 가능성을 확인하였다.

## 감사의 글

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.
- 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.
- Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geradts JP, Evers JL 1994 The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zona pellucida and embryos. *Fertil Steril* 62:793-798.
- Fulton, JE, 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*. 5<sup>th</sup> 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" 2<sup>nd</sup> EdCRC 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>
- 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.
- Kim H, Kim DH, Han JY, Choi SB, Ko YG, Do YJ, Seong HH, Kim SW 2013 Comparative study on the viability of frozen-thawed primordial germ cells using vitrification in chicken breed. *Korean J Poult Sci* 40:207-216.
- 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.
- Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T 2003 Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol Biochem* 28:479-480.
- 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.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L 1988 Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod* 3:117-119.
- 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.
- 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 102:321-325.
- Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JH 1995 Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Human Reprod* 10:3237-3242.
- Park TS, Hong YH, Kwon SC, Lim JM, Han JY 2003 Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ(EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 65:389-395.
- Petitte JN 2006 Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells. *Poultry Sci* 85:237-242.
- 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.
- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T 1996 Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291-299.
- Sutton RL 1991 Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday Trans* 87:101-105.
- Tamura K, Nomura N, Seki R, Yonei-Tamura S, Yokoyama H 2011 Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1, 2, and 3. *Science* 11:753-757.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T 1998 Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGC) in chicken. *J Exp Zool* 280:265-267.
- Tajima A, Barbato G, Kuwana, T, Hammerstedt, RH 2003 Conservation of a genetically selected broiler line(42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells(PCG) isolated by filtration method. *J Poult Sci* 40:53-61.
- Tajima A, Minematsu T, Ohara M 2004 Production of germ-line chimeras by the transfer of cryopreserved gonadal germ cells collected from 7- and 9-day old chick embryos. *J Anim Sci* 75:85-88.
- Watanabe M, Kinutani M, Naito M, Ochi O, Takashima Y 1992 Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development* 114:331-338.
- 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.
- 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)