한국재래닭 (오계) 원시생식세포의 완만동결과 급속동결의 비교

김성우¹ · 고응규¹ · 변미정¹ · 도윤정¹ · 한재용² · 김동훈¹ · 성환후^{1*} · 김 현^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²서울대학교 동물자원학과

Comparison of Vitrification and Slow Freezing for the Cryopreservation of Chicken Primordial Germ Cell (Ogye)

Sung Woo Kim¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Mijeong Byun¹, Yoon Jung Do¹, Jae Yong Han², Dong Hun Kim¹,
Hwan-Hoo Seong^{1*} and Hyun Kim^{1*}

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

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

ABSTRACT

We sought to provide a method for freezing and preserving primordial germ cells, or an avian germ cell of a bird, as a material for developmental engineering or species preservation. The aim of this study was to compare the efficacy of slow freezing with a vitrification method for the cryopreservation of chicken primordial germ cells (PGCs). PGCs obtained from the germinal gonad of day 5.5-6 day (stage 28) cultured chick embryos, using the MACS method, were classified into two groups: slow freezing and vitrification. We examined the viability of PGCs after Cryopreservation. Four freezing methods were compared with each other, including the following: Method 1: The PGCs were frozen by a programmed freezer in a plastic straw, including 2.0 M ethylene glycol (EG) as cryoprotective additive (slow freezing) Method 2: The PGCs were vitrified in a plastic straw, including 8.0 M EG, plus 7% polyvinylpyrrolidone (PVP) (rapid freezing). Method 3: The slow freezing was induced with a cryotube including 2.0 M EG Method 4: The PGCs were frozen in a cryotube including 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (rapid freezing). After freezing and thawing, survival rates of the frozen-thawed PGCs from Method 1 to 4 were 76.4%, 70.6%, 80.5% and 78.1% ($p < 0.05$), respectively. The slow freezing (-80°C programmed freezer) method may provide better survival rates of frozen-thawed PGCs than the vitrification method for the cryopreservation of PGCs. Therefore, these systems may contribute to the cryopreservation of a rare avian species.

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

서 론

가축유전자원의 보존 및 관리는 여러 국제기구에서 쟁점화되고 있는데, 특히, CBD (convention on biological diversity: 생물다양성 협약) 가축의 유전적 다양성 보존은 지속 가능한 축산업 발전에 필수적인 요소이다. 축산업의 기반이 되는 품종육성 및 개량기술에는 품종 다양성이나 개체의 다양성이 전제되어야 한다. 그러나 축산업의 발전은, 특히 가금산업의 발전은 아이러니 하게도 품종 다양성을 극단적으로 좁게 만들고 있으며, 개량 기술도 집단 내 유전적 다양성을 감소시키는 방향으로 작용하고 있는 실정이다. 또한, 고병원성조류인플루엔자 (HPAI) 등의 심각한 인수공통전염병에 대비하여, 한국재래종을 시작으로 해서 희귀한 지역 특산 닭뿐만이

아니라 상업적으로 매우 중요한 실용계를 생산하는 종계의 유전자원을 완전한 형태로 장기보존 방법에 관한 연구가 시급한 실정이다. 일반적으로, 이러한 위협에 대하여 닭의 유전자원의 보존은 살아 있는 최소한도의 집단을 살아 있는 형태로 다른 장소에 중복보존하고, 사육하여 계대하는 방법에 주로 의존하고 있다. 그러나, 생체의 중복보존은 악성질병 발생에 대한 위험성으로부터 완전히 보호하기 위해서는 여러 군데에 개체를 나누어서 사육해야만 하고, 격리시설, 방역시설과 위생유지비용에 대한 막대한 경비가 필요할 뿐만 아니라, 많은 인력과 토지가 요구된다. 그러므로 일본의 Naito 등 (2003)은 이러한 문제점 때문에, 닭의 유전자원은 생식세포 등의 세포수준의 방법을 이용하는 것이 바람직하다고 보고하고 있다.

* Corresponding author : Hyun Kim, Ph.D. Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea. Tel: 82-63-620-3525, Fax: 82-63-620-3591, E-mail: kim7268@korea.kr

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

조류 중에서는, 정액의 동결보존은 벌써 닭 (Polge, 1951), 칠면조 (Baks과 Sexton, 1979), 오리 (Maeda 등, 1984) 그리고 몇몇 종류의 야생종의 조류들 예를 들어 두루미 (Gee 등, 1985)에서 시도되었으며 영구보존이 이루어져왔다. 이와는 대조적으로, 난자와 초기배자의 동결보존을 위한 효율적인 방법은 아직까지 개발되어 있지 못하다. 왜냐하면, 난자의 생리학적 그리고 난자의 해부조직학적인 특징들 때문에, 생식세포 (난자)의 보존을 위해서 동결 이외의 다른 방법들을 강구하고 있다. 특히, 닭 생식세포의 장기보존은, 정액과 초기 배자의 세포에 관한 연구가 보고 되고 있다 (Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Park 등, 2003; Petite 등, 2006).

보존하고 있는 한국 재래종 닭의 복원을 하기 위해서 동결정액을 이용한 윤환교배를 반복하고 있지만, 동결정액으로 유전자원을 보존할 경우, 조류의 성별을 결정하는 W 염색체세포상의 유전자는 보존이 불가능하며 유전자원의 소실 우려가 있고, 이에 따라, 지속적인 역교배를 하더라도 완전한 형태의 고유 한국 재래닭으로 복원하는 것은 불가능한 것이 사실이다. 이러한 가금 유전자원의 보존방법에 관한 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구자들의 노력에 의하여 초기배자유래 세포의 동결방법이 대안으로 제시되었다. 유전자원으로 세포동결보존에는 다분화 능력을 가진 배반엽세포를 이용하는 방법 (Watanabe 등, 1992)과 조류뿐만 아니라 포유류에도 존재하여 성세포로 분화 가능한 능력을 보유하고 있어 정소에서는 정원세포 (spermatogonia) 혹은 난소에서는 난원세포 (oogonia)로 분화하는 능력을 가진 세포인 원시생식세포 (Primordial germ cells: 이하 PGCs)를 이용하는 방법들이 있다. 이 두 방법 모두 다 보존 세포를 완전한 개체로 복원 하기 위해서는, 보존세포를 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 (Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Petite 등, 2006). 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.

Tajima 등 (1993)은 흰색 White Leghorn에서 Rhode Island Red chickens으로 PGCs를 전이 시키는 것에 의해서 생식선 키메라 (germline chimeras)를 최초로 제작하였다. 다른 연구자에 의한 보고에서도 (Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Petite 등, 2006) stage 13-16 (Hamburger와 Hamilton, 1951)의 초기배자의 대동맥의 혈액으로부터 닭 PGCs를 분리하고, 개체 복원을 위한 키메라 제작은 보존세포를 발생 단계가 같은 수여배자의 혈관으로 이식하는 방법을 이용하여 생식선 키메라를 형성하였다. Naito 등 (1994)은 최초로, 동결 보존된 닭 PGCs를 이식해서 생식선키메라를 제작하였다. Tajima 등 (1998)은 또한, 발생 5일째 배자부터 동결 보존된 닭 원시생식선유래 닭 PGCs를 이용하여 생식선 유래 키메라를 제작하였다. 이러한 연구들 모두는 완만동결

(Slow-Freezing)법을 사용하였다 (Naito 등, 1994; Tajima 등, 1998).

세포나 조직, 개체 등과 같은 생물학적 재료를 형태와 기능적인 변화가 일어나지 않은 상태로 저온에서 장기간 보관하고, 원래 상태의 기능을 회복하도록 해동하는 과정을 동결보존 (cryopreservation)이라 한다 (Yoon 등, 2007). 동결대상이 되는 세포나 조직의 대부분을 수분이 차지하고 있기 때문에, 이들의 제거 없이 동결하게 되면 세포 내의 수분이 날카로운 얼음결정 (ice crystal)을 형성하고 팽창하여 세포막과 내부 소 기관에 상해를 일으키게 된다. 결국 해동이나 융해 이후에 세포나 조직의 생존성을 해치게 된다 (Acker 등, 1999). 따라서 동결보존의 기본 원리는 세포의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결보호제 (cryoprotectant)의 삼투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음결정을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다. 또한 동결을 통해 세포 내 모든 생리 및 생화학적 반응의 속도를 느리게 하거나 차단함으로써 장기간의 보존이 가능하다. 배아의 동결에 관한 연구는 1972년 Whittingham 등은 DMSO를 사용하여 완만동결에 의해 생쥐 배아를 빙 결정 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다. 동결방법으로는 낮은 동결보호제의 농도와 완만한 냉각속도 (cooling speed)를 이용하여 세포 내의 수분을 서서히 탈수시키면서 동결하는 완만동결 (Slow-Freezing) 법과 고농도의 동결보호제와 초급속 냉각속도를 사용해, 세포를 -196°C 의 액체질소 (liquid nitrogen, LN2)에 직접 노출시켜 동결보존을 하는 급속동결 방법이 있다 (Bernard 등, 1996; Fahy 등, 1984; Rall 등, 1987). 세포 내 수분이 고농도의 동결보호제를 사용하여 초급속으로 동결시켜 높은 동결율과 응집력을 가지게 하는 급속동결 방법은 완만 동결과는 달리 동결과정 중에 발생하는 얼음결정 형성을 막아 난자의 세포질 손상을 줄일 수 있다 (Nakagata 등, 1989; Hotamisligil 등, 1996; Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998).

급속동결은 조작이 간단하며 고가의 기존의 자동 세포 동결기 (programmed freezer)가 필요 없으며 무엇보다도 얼음 결정이 원천적으로 형성되지 않아 상해를 최소화할 수 있다는 것이 대표적인 장점이다. 하지만 급속동결의 특성상 고농도의 동결 보호제가 필요함에 따라 세포독성과 삼투압으로 인한 세포의 손상이 나타난다는 단점도 있다. 일본 연구팀에 의하여 개발된 급속동결은 동결과정 및 보존과정에서 세포 외부의 배양액을 최소화 하여 생쥐와 인간의 발생중인 수정란 보존에 널리 사용되고 있으나, 완만동결과 급속동결 방법에서 사용되는 동결보호제의 농도는 상대적으로 적거나 높을 뿐, 실제적으로는 그 농도는 세포에게 매우 해로운 독성을 가지고 있기 때문에, 동결과정에서는 세심한 처리과정이 필요한 것으로 알려져 있다.

동결 보존 후 원시생식세포의 생존율에 있어서 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결-융해 과정 중 사용되는 동해방지제의 종류, 농도 및 처리 시간이다. 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동해방지제로서 DMSO, glycerol 그리고 propandiol

1.2-PROH)를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등 (1996)은 소 성숙난자를 ethylene glycol 을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 ethylene glycol을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동해방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민이 있으나 glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다 (Kim 등, 1996; Rayos 등, 1994; Zhu 등, 1993). 이러한 동결보존은 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 동결보존기술의 향상은 동결 및 융해 후 생존세포를 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 등, 1992). 더욱이 닭 PGCs의 배양체계는 아직까지 완전하게 확립되어 있지 않은 영역이라 성공적인 닭 PGCs의 동결보존은 유전자원 보존으로서 필수적인 기술로 추정된다. 일반적으로 닭 PGCs의 정제방법과 이식 방법에 의한 생식 계열 키메라 제작에 관한 연구결과를 많은 연구자들이 보고 (Natio 등, 1994; Han 등, 2002; Kino 등, 1997; Naito 등, 2003; Petite 등, 2006)하고 있으나 닭 PGCs의 동결방법에 관한 직접적인 비교 및 검토는 미진하다고 판단되었기에 본 연구에서 닭 PGCs의 동결 효율성을 증진시키는 방법에 관한 연구를 실시하였다. 특히, 닭 PGCs의 급속동결방법과 완만동결의 비교 검토로 동결보존기술이 증진된다면, 조류의 유전자원보존의 복원과 함께 형질전환 닭의 보존 방법에 관한 효율성이 증진 될 것으로 판단된다. 우선, 본 연구에서는 동결보존 기술의 개선에 의한 한국 재래닭 오계 PGCs의 동결 및 융해 후의 생존율을 높이기 위해서, 오계 PGCs의 동결 및 융해 후의 생존율을 검토하였으며 동결방법의 개선을 목적으로 완만동결법과 급속동결법을 비교 및 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 시험계의 사양관리

본 실험에 사용된 공시계 (Kim 등, 2011)는 국립축산과학원에서 생산된 종란을 인수하여 부화시킨 한국재래닭 3원 교잡종과 가축 유전자원시험장에서 보유하고 있는 44주령의 한국재래닭 오계 (Ogye) 수탉에서 정액을 각각 채취하여, 같은 주령의 암탉에 대하여 인공수정을 실시하여 생산된 수정란을 1일에서 21일까지 10~13℃, 습도 70~85%의 종란 보관용 배양기에서 집란하여 부화기에 입란하고 5.5일령의 발생란을 시료로 사용하였다. 사양관리는 한국 가금사양표준의 NRC 사양표준에 준한 시판 종계사료를 무제한 급여하였으며, 기타 관리는 관행에 준하였다. 또한, 모든 실험동물은

국립축산과학원의 실험동물 사용 및 복지에 관한 규정 및 허가에 의해 공시 되었다.

2. PGCs의 채취

본 실험은 국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 사육중인 실험 축을 사용하여 Hamburger-Hamilton (1951) 의 배 발달 단계에 기초하여, 37.8℃, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. 원시생식선으로부터 분리방법은 5.5일 (stage 28: (Hamburger와 Hamilton, 1951) 동안 발생한 초기배자를 Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 가 함유 되지 않은 PBS (PBS(-), Sigma, St. Louis, MO, USA)가 담긴 큰 배양접시에 옮긴 후, 실체 현미경 (SZH; Tokyo, Japan) 하에서 예리한 핀셋을 이용하여 원시생식선 부분만을 분리한 후, MACS법에 의해 분리 및 순수 정제를 하기 위해, 이를 1.5 mL 튜브에 수집하여 실온에 두었다.

3. MACS법에 의한 분리 및 정제

Park 등의 실험 방법을 조금 응용하여, 원시생식선은 0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)가 함유된 0.05% (v:v) trypsin 용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 이 함유된 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣어 두었다. 그리고 튜브는 37.8℃에 2분간, 배양 처리를 했다. Trypsin 처리 후, trypsin-EDTA의 불활성을 위해서 10% fetal bovine serum (FBS: Sigma, St. Louis, MO, USA) 을 처리하였다. 큰 세포 다발 그리고 분해되지 않은 조직의 단편들을 제거하기 위해서, 세포 부유액은 20 μ m 격자크기의 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 정제 하였다 (Kim 등, 2004). 원심분리 후 생식선세포 (한 개의 tube 당 3×10^6 에서 5×10^6)는 SSEA-1 항체를 이용해서, MACS 방법으로 순수 gPGCs를 정제하였다. 닭 생식선 유래 세포 혼합물을 PGC-specific antibody로 알려진 anti-stage specific embryo antigen (anti-SSEA)-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, mouse IgM isotype: SSEA-1, MC-480)를 5% NGS/PBS에 1:200으로 희석하여 실온 20~25℃에서 20분간 반응을 시켰다. PBS에 0.5% BSA와 2 mM EDTA가 함유된 1 mL MACS buffer로 세정을 하고, 200 g에 5분간 원심분리 하고 나서 상층액을 완전히 제거한다. 아래에 침전된 세포괴를 rat anti-mouse IgM microbeads 20 μ L가 포함된 100 μ L MACS buffer와 천천히 혼합하여 4℃에 15분 간 반응하고, 처리된 세포들은 조심스럽게 500 μ L buffer를 첨가해 동일한 방법으로 세정을 하고 나서, MACS 컬럼을 이용하여 정제하였다 (Kim 등, 2004).

4. PGCs의 동결 및 융해실험

각 군의 PGCs 세포 수는 약 200개 정도로 조절하고, 세포의 생존을 측정은 0.4% Trypan blue 염색액을 이용하여 (Freshney, 2005) 효율을 계산하였다. 동결방법은 10% DMSO를 동결보호물질 (cryoprotectant: 이하 CPA)로 이용하는 방법 (Naito 등, 1994) 과 가축배자의 동결보존에 사용 되는 EG를 CPA로 하는 완만동결법 (slow freezing, SF) 및 급속동결법 (rapid freezing, RF)를 비교 검토했다. 또한 모든 동결 및 융해 실험은 총 8회에 걸친 반복을 실시하였다.

(1) CPA독성 검사

실험군은 동결 및 융해 실험에 사용하는 CPA를 다음과 같이 설정하고, 25℃ 혹은 4℃에서 반응시키고, 생존율을 검정했다. 그리고, CPA의 동결과 융해의 기본용액은 0.5% Bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Sigma)를 사용했다. 1) 2.0 M EG 동결보호제의 상온상태 처리: 닭 PGCs를 2.0 M EG 50 µL에 현탁하고, 1.5 mL 용 동결용 Cryotube (Corning, Cat. No. 25723-1)에서 실온 (25℃)에서 15분간 정치했다. 2) 2.0 M EG 동결보호제의 저온상태 처리: 1)과 동일한 처리를 10% DMSO 4℃에서 실시했다. 3) 10% DMSO 동결보호제의 저온상태 처리: 2)와 동일한 처리를 10% DMSO 용액에서 실시했다. 4) 8.0 M EG + 7% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP: average molecular weight 10,000, SIGMA) 저온상태 처리: 닭 PGCs를 2.0 M EG용액 15 µL에 현탁하고, 1.5 mL tube 내에서 4℃에 5분 간 정치한 뒤 8.0 M EG 용액을 50 µL 첨가했다. 1분 후, 1.7 M galactose 용액을 300 µL 첨가하여 바로 원심분리를 실시한 후, 상층액을 제거하고, 튜브 내의 침전을 1 mL의 동결액에 현탁하여 실험에 사용하였다.

(2) 동결 및 융해

CPA 독성을 조사했을 때와 같이 CPA를 이용해서, SF 및 RF에 대해서 생존율을 검정했다. 1) SF: 닭 PGCs를 2.0 M EG 50 µL에 현탁해서 두고, 기본 동결용액인 D-PBS (+0.5% BSA) 150 µL를 혼합하여 0.25 mL 플라스틱제 스트로 (EcoStraw transparent, FHK, Japan)에 흡입하고, 선단부를 봉입해서, 프로그램 freezer (Freezer Control CL-863, Cryologic, Australia) 에서 동결하였다. 동결과정 중, -7℃에서 10분간 정치한 다음, 초당 -0.6℃ 속도로 -35℃까지 냉각하고, 액체질소 (LN₂) 내로 직접 침지하였다. 스트로 내에는, 사전에 D-PBS를 충원해 두고, 흡입 시에 CPA와 섞이지 않게 하기 위해서 기포를 약 2 mm 정도 채워 구분하였다. 2) RF: PGCs를 2.0 M EG 동결배양액 15 mL에 현탁하고, 5분간 정치한 후, 8.0 M EG + 7% PVP 동결배양액을 50 mL 첨가하고, 플라스틱제 스트로에 흡입시키고, 선단부를 봉입한 후, 곧바로 액체질소 (LN₂) 내에 투입했다. 스트로 내에는 1.7 M galactose 동결배양액 150 µL를 사전에 충전해 두었다. 3) SF: 동결용 Cryotube에 2.0 M EG 50 µL에 현탁한 닭 PGCs를 넣고, -80℃ 초저온 냉동고에서 3시간 정치한 후 액체질소 (LN₂) 내에 투입

했다. 4) SF: CPA로써 10% DMSO를 사용하고 동결방법은 3)과 동일한 처리를 이용하였다. 동결과정에서 동결배양액과 PGCs의 반응은 전부 4℃에서 실시했다. 융해방법은, 동결보존된 스트로 및 Cryotube를 액체질소 (LN₂)로부터 공기 중으로 약 5초간 상온에 유지하고 나서, 25℃로 맞추어진 수조에서 10초 또는 완전히 융해될 때까지 온도를 상승시켰다. D-MEM 배양액을 미리 충전한 1.5 mL 튜브에 융해된 세포를 옮기고, 240 G에서 6분간 원심분리를 실시하여 상층액과 함께 CPA를 제거하였다. 새로운 D-MEM에 세포피를 현탁하고, 24 well plate에 옮겨 생존율을 조사했다. 급속동결 한 스트로의 경우에는 배양액과 동결용액을 혼합하고 나서 동일한 처리를 실시했다.

5. 통계분석

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

결 과

닭 PGCs의 동결실험에서 SF를 위한 CPA로 DMSO와 세포독성이 낮은 EG를 비교하였으며 가축배아의 동결보존에서 우수한 생존율을 얻고 있는 RF에 관한 실험을 실시하였다. 닭 PGCs에 대해서, 4 종류의 방법으로 DMSO와 EG의 독성을 비교 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 2.0 M EG에 실온과 4℃에서 15분간 처리된 닭 PGCs의 생존율은 각각 81.5% 그리고 81.6% 였다. 그러나 DMSO에 4℃에서 15분간 처리된 결과는 생존율 73.3%이고, 2.0 M EG 처리구와 비교하면 생존율이 유의적 ($P<0.05$)으로 낮음을 확인하였다. 한편, RF의 CPA인 8.0 M EG + 7% PVP에 4℃로 반응한 결과, 생존율은 69.7%였고, 다른 처리구와 비교해서 유의적으로 가장 낮음을 알 수가 있었다 ($P<0.05$). 이것은, 8.0 M 이라고 하는 고장액에 의해서, 닭 PGCs에 어떠한 형태로든 손상이 주어졌다고 생각 되어진다. 이상의 결과로부터, 닭 PGCs의 동결 및 융해 후, 생존율이 가장 높은 동결방법은 2.0 M EG를 항동해제로 이용하는 방법임을 확인하였다. 또한, 각각의 동결보존법에 의해서 세포를 동결 및 융해 후의 생존율을 조사한 결과는 Table 2에서 살펴볼 수 있다. 닭 PGCs의 동결보존실험에서는 2.0 M EG를 CPA로써 세포동결용 Cryotube에 의한 SF가 80.5%로 가장 높은 생존율을 나타내었지만, 가장 널리 이용되는 동결보존법인 10% DMSO를 CPA로 이용한 세포동결용 Cryotube에 의한 SF 처리구에서는 생존율이 78.1%로 관찰되었으나, 양쪽 처리구 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 2.0 M EG를 이용한 동결용 플라스틱 스트로 (0.5 mL) 처리구에 의한 SF의 생존율은, 76.4%이고, 10% DMSO와의 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 2.0 M EG의 동결용 Cryotube에 의한 SF 와의 사이에서는 유의적인 차이가 보였다 ($P<0.05$).

Table 1. Effects of different CPAs on viability of PGCs

CPA	Temperature (°C)	Exposure Time (min)	Survival rate (%)
2.0M EG	25 °C	15 mim	81.5±1.24 ^a
2.0M EG	4 °C	15 mim	81.6±2.91 ^a
10% DMSO	25 °C	15 mim	66.9±1.05 ^b
10% DMSO	4 °C	15 mim	73.3±1.85 ^b
8.0M EG + 7% PVP	25 °C	1 mim	61.4±1.69 ^c
8.0M EG + 7% PVP	4 °C	1 mim	69.7±3.99 ^b

Survival rate; the number of live GGCs/total treated GGCs × 100.

CPA: Cryoprotectant, EG: Ethylene Glycol, PVP: Polyvinyl-Pyrrolidone, DMSO: Dimethyl Sulfoxide.

^{a-c} Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of different cryopreservation way on viability of frozen-thawed PGCs

CPA	Freezing Methods	Survival rate (%)
2.0M EG	Straw SF*	76.4±1.69 ^b
8.0M EG + 7% PVP	Straw RF	70.6±5.68 ^c
10% DMSO	Straw SF**	77.6±0.45 ^b
2.0M EG	Cryotube SF**	80.5±3.54 ^a
8.0M EG + 7% PVP	Cryotube SF**	69.8±2.46 ^c
10% DMSO	Cryotube RF	78.1±0.60 ^b

Survival rate; (the rate of frozen GGCs/unfrozen GGCs) × 100.

CPA: Cryoprotectant, EG: Ethylene Glycol, PVP: Polyvinyl-Pyrrolidone, DMSO: Dimethyl Sulfoxide.

^{a-c} Values with different superscripts within columns are significantly different ($p < 0.05$).

SF* : Slow Freezing (Program Freezer),

SF** : Slow Freezing (−80°C Freezer),

RF : Rapid Freezing (Vitrification).

고 찰

닭 PGCs 동결보존기술은 아직 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만 무엇보다 성공적인 닭 PGCs의 동결보존의 핵심요소는 동결보호제의 선택에 있는 것으로 추정된다. 일반적으로 동결보호제는 저 분자 물질이며 세포에 대한 독성이 낮고 세포 내에 침투가 용이한 특성을 가져야 한다. 그 이유는 동결보호제는 세포 내에서 얼음결정의 형성 (Sutton 등, 1991; Gardner 등, 2000)을 방지해야 하거나 그 크기가 세포손상을 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 등, 1996). 즉, 동결보호제의 역할은 동결 시 생기는 얼음 결정 및

고농도 용매에 의한 세포 손상을 막는 것이다. 동결보호제로 많이 사용되어 온 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 비침투성동결보호제 (non-permeable CPA)로 구분된다 (Lovelock 등, 1959; Boutron 등, 1984). 본 연구에서는 투과성 (EG, DMSO) 및 비 투과성 억제제 polyvinylpyrrolidone (PVP) 를 가지고, 동결 및 용해 후의 닭 PGCs의 생존율에 관한 조사를 실시하였다. Meryman 등 (2007)은 세포 동결에 있어서 중요한 요인으로 동결속도, 세포와 동결보호제의 종류 그리고 동결과정 중에서 변화하는 삼투압에 의한 세포손상을 최대한 줄일 수 있어 세포에 최적화된 동결 배양액을 선택 하는 것이 가장 중요하다고 보고했다. 투과성 동결보호제의 경우 세포 내의 투과 속도가 각각 다르다. DMSO의 경우는 세포 내로의 침투속도가 약 20~30분이며, glycerol은 거의 60분 이상으로 매우 느린 것에 반해서 특히, 분자량이 비교적 작고 세포막 투과성이 다른 동결보호제에 비해 뛰어난 특성 있는 EG를 기본으로 만든 동결액의 경우는 세포 내로의 침투속도가 5~7분으로 매우 빠르다 (Friedler 등, 1988). 본 연구에서도 10% DMSO 및 8.0 M EG + 7% PVP 처리군 보다 2.0 M EG를 동결보호제로 사용한 군에서 동결 및 용해 후의 닭 PGCs의 생존율이 유의적으로 높은 것을 확인하였다. Friedler 등 (1988)의 보고를 고려해 볼 때, 빠르게 침투하여 삼투압의 평형에 도달한 결과, 삼투압의 충격이 거의 없고, 처리시간이 짧아짐으로써 닭 PGCs에 미치는 영향을 최소화 할 가능성이 존재한다. 이런 이유로 EG는 동결보호제로 가장 널리 사용되고 있으며 (Martino 등, 1996; Sommerfeld 등, 1999), 포유동물의 난자의 유리화 동결에 적당한 동결보호제로 알려져 있다 (Bautista 등, 1998). 또한 EG를 이용하여 동결보존 하였을 경우 다른 보존액을 이용했을 때 보다 난자나 배아가 발생이 잘 진행되었다고 보고된 바가 있다 (Chi 등, 2002; Kim 등, 2004). 동결 보호제는 종류에 따라 각각 세포막에 대한 다른 침투능력을 가지며, 이는 세포 내 독성뿐만 아니라 세포의 생존률에도 다양한 영향을 미친다. DMSO의 경우에는 다른 동결 보호제에 비하여 확산속도가 느리며, 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가 또는 동결 후 세포 증식을 억제 (Takase, 등 1992), 세포 소기관 분열 및 세포분화 중 DNA methylation 등에 영향을 미치는 등과 같은 단점에 관한 연구 결과들이 보고된 바 있다 (Kotobuki 등, 2005; Rezazadeh 등, 2009).

완만동결법은 세포 내의 유리수를 침투성 동결보호제와 교체하도록 유도한 다음, 천천히 냉각시켜 일정한 온도에 도달한 후 세포질 내에 얼음결정이 형성되지 않도록 외부에 식빙을 하고 충분히 낮은 온도에 도달하면 보존하는 방법으로, 용해 역시 일정한 온도의 조건에서부터 용해를 시작한다. 하지만 매우 복잡한 단계를 거치는 동결과 용해과정 동안 세포가 손상될 가능성이 매우 높다. 즉, 세

포내의 얼음결정형성, 용액 자체의 독성과 세포의 삼투압 변화 등 동결 시 세포에 손상을 주는 요인들이 많으며, 외부 얼음결정의 성장에 의해 세포가 물리적으로 직접 손상될 수도 있다(Miyake 등, 1993). 냉각 속도와 용해 속도는 얼음결정의 크기와 용해시 재형성에 미치는 영향이 매우 큰 것으로 보고되었다(Sutton 등, 1991; Gardner 등, 2000). 냉각 속도가 너무 빠르면 얼음결정 형성의 증식이 과다해지고 또한 너무 느려도 심한 탈수로 인한 염분의 침착이 문제가 된다. 느린 용해는 결정이 크게 자랄 수 있는 기회를 주고 결국, 세포에 손상을 주게 되지만 급속 용해는 얼음결정의 용해를 촉진하고 얼음 결정이 다시 자라는 시간을 단축하여 준다(Hey 등, 1996). 급속 동결법은 세포를 급속히 동결시키고 동결용액의 점성을 증가시켜 세포 내·외의 유리수가 비결정형으로 유지되는 동결법이다. 그러나 급속동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 동결 및 용해의 과정에서 얼음결정화가 일어나 세포에 손상을 주기 때문에 Rall 등(1987)은 결정화가 일어나지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결보호제를 사용했다. 본 연구에서도 동결 방법에 따라서 완만동결은 2.0 M의 저농도의 동결보호제(Bautista 등, 1998)를 사용하고, 급속동결에서는 8.0 M EG의 고농도의 동결보호제를 사용했다.

동결 및 용해가 세포에 주는 손상을 최소화 하기 위해 동결보호제는 매우 중요한 역할을 하지만, 그 동결보호제의 독성 또한 세포에 손상을 줄 수 있다. 동결보호제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 상해로 나눌 수 있다(Newton 등, 1999). 생식세포에 끼치는 동결보호제 독성은 아직도 밝혀지지 않은 것들이 많다. Kuleshova 등(2001)은 동결보호제의 독성을 줄이기 위해서는 동결보호제에 노출 시간을 최소한도로 줄여야 한다고 주장하였다. 일반적으로 수정란과 같은 단세포 동결 시 동결보호제 처리시간은 20분 미만이다. 그러나 난소와 같은 다양한 크기의 여러 세포로 이루어진 조직은 동결보호제 노출 시간이 30분 이상 되어야 적절한 동결보호제 침투를 이룰 수 있다고 보고했다(Newton 등, 1998). 닭 PGCs의 형태학적인 특징 중의 하나인 일반 세포에 비해 부피가 크고 더불어 수분함유량이 비교적 많아 이를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 특히, 얼음결정의 형성을 근본적으로 피할 수 있는 급속동결법을 검토하였다. 완만동결법에 비해 동결 및 용해 후의 닭 PGCs의 생존율은 유의적인 차이는 없었지만, 동결보호제와 보관용기의 조합에 따라 용해 후의 닭 PGCs의 생존율에 차이가 있는 것을 확인했다. 이와 같은 급속동결은 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. 하지만, 본 연구 결과로부터 방법상의 특성 등으로 고농도(8.0 M EG)의 동결보호제 처리로 인한 독성 혹은 삼투압으로 인한 닭 PGCs의 손상을 초래했을 가능성이 존재한다. 차후에 닭 PGCs 동결보호제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포독성을 줄이는 방법의 확립과 이를 통해 닭 PGCs내 투과 속도가 높고 독성이 적은 동결보호제를 도입 하거나, 투과성과 비 투과성 동결보호제를 조합하여 상제적인 농도변화 없이 절대적

인 농도를 낮추는 방법을 통해서 최종적으로 닭 PGCs에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결 및 용해 후, 효율을 증진시키는 방법 개발 등에 관해서 좀 더 구체적으로 검토 해야 할 필요성이 있다. 이외에도 용액이 노출되는 온도 및 보관용기의 열전도율, 동결용액의 양, 연구자의 숙련도와 배아 발달시기 및 질 등이 급속동결의 결과에 미치는 영향이 생식세포 및 배아 등에서 많이 연구되고 있다(Kuleshova 등, 1999; Lee 등, 2009; Saha 등, 1996). 실제로 반고체 상태인 슬러시 상태의 질소(slushnitrogen, SN2)를 사용하여 열전도율을 증진 시키는 방법으로 난자와 배아의 급속동결 후 생존율과 배아 발생의 증진을 보고한 연구도 있다(Arav 등, 2002; Yavin 등, 2009; Yoon 등, 2007). 하지만, 닭 PGCs에서는 미흡한 실정이다. 따라서 급속동결법이 더욱 효과적으로 널리 이용할 수 있게 하기 위해서는 동결대상인 닭 PGCs를 위한 급속동결액 성분의 조합을 통한 독성감소의 전략이 더욱 절실하다.

가축유전자원으로서 세포은행 구축을 위한 기반 기술로 이용되고 있는 동결 기술은 재생의학과 조직공학에서의 임상적 적용을 위한 세포의 중요한 기술로 이용될 가능성이 높다. 특히, 닭 PGCs의 경우 제한된 세포 공급 때문에 세포은행에서 장기간 저장의 중요성은 더욱 더 강조 되어 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. 그러므로, 닭 PGCs의 동결보존기술 향상에 의해 동결 및 용해 후의 많은 생존세포를 확보 하는 방안과 생식계열 키메라의 제작효율을 높이는 방법은 반드시 필요하다. 닭 PGCs의 동결에 관한 기초 자료를 얻기 위하여 본 실험에서는 2개의 다른 동결보호제인 DMSO와 EG를 단독으로 사용하거나 2개의 조합하여 닭 PGCs를 동결하고, 세포의 생존율에 대해 비교 검토, 조사 하였다.

닭 PGCs의 동결보존은 형질전환 닭의 생산에 있어서 닭 PGCs의 유전자도입 실험의 설계를 용이하게 계획하기 위하여 필수적인 기술로 추정되고, 기존의 생산된 형질전환 닭의 유전자원 보존을 위하여 형질전환개체의 후대 종란의 PGCs를 보존하는 방안에서도 이용될 가능성이 높다. 본 연구에서 Naito 등(1994)의 연구에 이용되었던 DMSO에 대해서, EG를 비교검토 한 결과, 동결용기(cryotube)에 의한 SF에서는 생존율에 유의적인 차이는 없었다. Naito 등은 40 μ L의 CPA에 대해서 PGCs를 약 3,000개 라고 하는 고밀도에서 동결보존을 실시하였기 때문에 세밀한 비교는 할 수 없었을 것으로 추정되며 본 연구에서 이용된 PGCs의 SF에 관한 결과는 비록 통계적인 유의성은 보이지 않았으나 EG가 일반적으로 일반세포주의 동결에 CPA로써 많이 이용되어 왔던 DMSO 보다 동결 및 용해 후의 세포생존율이 높은 경향을 확인했다. 또한, 동일한 2.0 M EG를 CPA로 이용할 경우, 동결보존 용기로서 cryotube를 이용한 SF는 동결용스트로(0.5 mL)에 의한 SF 보다도 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 이것은 동결용 스트로의 벽이 더 얇기 때문에 온도 변화가 신속하게 전달되며 세포에 대하여 정확한 온도 조절로 부하가 작을 것으로 예상되어 동결용기

cryotube를 이용하는 결과보다 동결 및 융해 후의 닭 PGCs의 생존율이 우수 할 것이라고 추정된 것과 상반되는 결과를 관찰하였다. 이는 오히려, 동결용 스트로 용기의 얇은 벽에 의하여 PGCs의 동결과정과 동결 후 보존과정 및 융해 시의 온도변화에 따른 충격 등과 같은 환경적인 요인으로 인하여 닭 PGCs가 많은 손상을 입었을 가능성도 배제할 수가 없다. 본 연구에서 RF의 낮은 생존율은 동결 전의 8.0 M EG + 7% PVP의 반응에 의해서, 이미 세포에 손상이 발생하고 있는 것이 결과적으로 융해 후의 생존율을 저하시키는 원인으로 추측된다. DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고 가장 광범위하게 사용되고 있는 세포 동결보호제로 알려져 있지만 본 연구에서 닭 PGCs의 동결방법에는 동결속도와 동결용기의 선택과 조합에 따라서 DMSO 뿐만 아니라, 동결보호제로써 10% 농도의 EG도 이용할 수 있음을 확인하였다. 이번 실험 결과들로부터 닭 PGCs를 유전자원으로 영구 보존하기 위하여 동결용 스트로와 동결용 Cryotube 모두 이용할 수 있음이 증명 되었으며 자동세포동결기(programmed freezer)와 같은 정확한 온도조절이 가능한 장비의 이용으로 동결용 튜브에 의한 동결보존의 효율성은 더욱 증진될 것으로 추정된다. 닭 PGCs의 동결 및 융해 기술은 멸종위기의 야생조류와 희귀조류와 같은 경제적 가치가 큰 동물의 생식세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다. 그러므로 조류 PGCs의 대량확보 수단으로서의 닭 PGCs 동결보존기술 개발이 우선 요구되고 있는 실정이며, 본 연구에서 제안하는 닭 PGCs의 동결방법은 하나의 대안으로 활용 가치가 높다고 추정된다.

요 약

동결 닭 PGCs의 생식계열 키메라를 이용한 생체로의 복원을 실험하기 위해서는, 닭 PGCs의 동결보존기술의 향상에 의해 동결 및 융해 후의 많은 생존세포를 확보 하는 것과, 생식계열 키메라의 제작효율을 높이는 것이 반드시 필요하다. 닭 PGCs는 배양 5.5일령의 닭 원시생식선으로부터 채취하고, MACS 방법에 의해서 순수 닭 PGCs를 분리했다. 닭 PGCs의 동결보존실험결과 다음의 4종류의 동결방법을 각각 비교 검토했다. 1. 플라스틱 스트로에 의한 완만동결법(SF), 동결보호물질은 2 M 에틸렌 글리콜(EG), 2. 스트로에 의한 급속동결법(RF), 8 M EG + 7% PVP, 3. 동결용 Cryotube에 의한 SF, 2M EG, 4. 튜브에 의한 SF, 10% DMSO. 동결 및 융해 후의 PGCs의 생존율은 각각 76.4%, 70.6%, 80.5%, 78.1%로 관찰되었다.

(주제어: 원시생식세포, 급속동결, 완만동결, 생존율, 오계)

감사의 글

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

인 용 문 헌

- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I. and Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 187:77-81.
- Acker, JP, Larese, A., Yang, H., Petrenko, A. and McGann, LE. 1999. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology.* 38:363-371.
- Bakst, MR. and Sexton, TJ. 1979. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility.* 55:1-7.
- Bautista, JA., Dela, Pena, EC., Katagiri, S., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1998. *In vitro* viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn J Vet Res.* 46:13-18.
- Bautista, J.A. and 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.
- Bernard, A. and Fuller, BJ. 1996. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update.* 2:193-207.
- Boutron, P. A. 1984. 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.
- 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.
- Fahy, GM., MacFarlane, DR., Angell, CA. and 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. and Lamb, EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril.* 49:743-764.
- Gardner, DK. and Lane, M. 2000. Embryo culture systems. In "Handbook of *in vitro* Fertilization". 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 205-264.
- Gee, GF., Bakst, MR. and Sexton, TJ. 1985. Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane. *Journal of Wildlife Management.* 49:480-484.
- Hamburger, V. and Hamilton, HL. 1951. A series of normal 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. and 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. and MarFarlane, DR. 1996. Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulphoxide. *Cryobiology*. 33:205-216.
- Hotamisligil, S., Toner, M. and 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, H., Choi, JS., Yang, BS., Ko, YG., Kim, JH., Choi, SB. and Kim, SW. 2011. A comparison of reproductive ability on various korean native chicken. *Reprod. Dev. Biol*. 35:391-394.
- Kim, JN., Kim, MA., Park, TS., Kim, DK., Park, HJ., Ono, T., Lim, JM. and Han, JY. 2004. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol Reprod Dev*. 68:81-87.
- Kim, MK., Lee, SJ., Uhm, EY., Yoon, SH., Park, SP., Chung, KS. and Lim, JH. 1996. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *Korean J Animal Reprod*. 20:119-126.
- Kino, K., Pain, B., Leibo, SP., Clark, ME. and 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. and Ohgushi, H. 2005. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng*. 11:663-673.
- Kuleshova, LL., MacFarlane, DR., Trounson, AO. and 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*. 38:119-130.
- Kuleshova, LL., Shaw, JM. and Trounson, AO. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*. 43:21-31.
- Lee, DR. and 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. and Bishop, MWH. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 183:1394-1395.
- Maeda, T., Terada, T. and Tsutsumi, Y. 1984. Morphological observations on frozen and thawed Muscovy spermatozoa. *British Poultry Science*. 25:409-413.
- Martino, A., Songsasen, N. and 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. and 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. and 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.
- Naito, M. 2003. Cryopreservation of Avian Germline cells and subsequent production of viable offspring. *Journal of Poultry Science*. 40:1-12.
- Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod Fertil*. 87:479-483.
- Newton, H., Pegg, DE., Barrass, R. and Gosden, RG. 1999. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocyte. *J. Reprod Fertil*. 117:27-33.
- Newton, H., Fisher, J., Arnold, JR., Pegg, DE., Faddy, MJ. and Gosden, RG. 1998. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod*. 13:376-380.
- Park, TS., Jeong, DK., Kim, JN., Song, GH., Hong, YH., Lim, JM. and Han, JY. 2003. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod*. 68:1657-1662.
- Petitte, JN. 2006. Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordioal germ cells. *Poultry Sci*. 85:237-242.
- Polge, C. 1951. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C . *Nature*. 167:949-950.
- Rall, WF., Wood, MJ., Kirby, C. and Whittingham, DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod Fert*. 80:499-504.
- Rayos, AA., Takahashi, Y., Hishinuma, M. and Kanagawa, H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil*. 68:100-123.
- Rezazadeh, VM., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F. and Movaghar, B. 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet*. 26:347-354.
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C. and Suzuki, T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*. 33:291-299.
- Sommerfeld, V. and Niemann, H. 1999. Cryopreservation of bovine

- in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38:95-105.
- Sutton, RL. 1991. Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J. Chem Soc Faraday Trans.* 87:101-105.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*. 40:509-519.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *Journal of Experimental Zoology*. 260:265-267.
- Takase, K., Sawai, M., Yamamoto, K., Yata, J., Takasaki, Y., Teraoka, H. and 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.
- Vajta, G., Holm, P. and 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.
- Watanabe, M., Kinutani, M., Naito, M., Ochi, O. and Takashima, Y. 1992. Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development*. 114:331-338.
- Whittingham, DG., Leibo, SP. and Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science NY*. 187:411-414.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. and Jakob, U. 1992. Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature*. 358:169-170.
- Yasuda, Y., Tajima, A., Fujimoto, T. and Kuwana, T. A 1992. 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. and 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. and 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. and Machida, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod Fertil*. 98:139-145.

(Received Jun. 17, 2013; Revised Aug. 12, 2013; Accepted Sep. 13, 2013)