

릿한 세포경계를 지닌 편평한 colony의 형태로 성장하였다. SNUhES1과 3은 정상적인 46,XY의 핵형을 보였으며 SNUhES2는 정상적인 46,XX의 핵형을 보였다. 배아줄기세포의 미분화 특성 확인 결과 alkaline phosphatase 및 SSEA-4가 강하게 발현되었고 SSEA-3는 부분적인 발현을 하였다. 세 개의 세포주 모두 Oct-4와 telomerase가 발현되었다.

**결 론:** 이상의 결과로 세 개의 인간배아줄기세포주를 확립하였다. 앞으로는 확립된 세포주를 이용하여 자발적인 분화와 함께 인위적으로 유도된 분화에 관련된 여러 현상들을 연구하고자 한다.

## P-29 배양액의 조성차이에 따른 인간 배아 줄기세포의 계대 배양에 관한 비교 연구

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소<sup>1</sup>, 의과대학 산부인과학교실<sup>2</sup>

안희진<sup>1</sup> · 김희선<sup>1</sup> · 김윤영<sup>1</sup> · 설혜원<sup>1</sup> · 오선경<sup>1,2</sup> · 서창석<sup>2</sup>  
김석현<sup>2</sup> · 최영민<sup>2</sup> · 문신용<sup>1,2</sup>

**목 적:** 최근 인간 배아 줄기세포를 이용한 실험이 급속히 증가하면서 계대 배양에 사용되는 배양액의 종류와 첨가되는 물질의 조성이 다양해지고 있다. 이에 조성이 다른 배양액을 이용하여 보다 효과적인 인간 배아 줄기세포의 계대 배양 방법을 알아보려고 하였다.

**대상 및 방법:** 본 연구실에서 확립된 SNUhES2에 각기 다른 조성을 가진 배양액을 첨가하여 3계대에 걸쳐 배양에 미치는 영향을 살펴보았다. 기본 배양액으로 Knockout-DMEM과 DMEM-F12를 사용하였으며, 기본 배양액에 fetal bovine serum (FBS, Hyclone)과 serum replacement (SR, Gibco)을 따로 첨가하여 4가지 종류 (KO-DMEM/FBS, KO-DMEM/SR, DMEM-F12/FBS & DMEM-F12/SR)의 배양액을 준비하였다. SR이 첨가된 배양액에는 bFGF를 첨가하였다. 각각의 배양액을 이용하여 SNUhES2를 3계대까지 배양하였다. 각 실험군의 배아 줄기세포군의 부착률과 분화률, 형태와 면적을 관찰하였으며, alkaline phosphatase 활성도와 SSEA-1, 3 & 4의 발현여부, 그리고 Oct-4 mRNA의 발현여부를 확인하여 배아 줄기세포의 미분화 특성을 확인하였다.

**결 과:** 배아 줄기세포군의 부착률은 KO-DMEM/SR과 DMEM-F12/SR 실험군에 비해 각 배양액에 FBS를 첨가한 두 군에서 현저하게 낮게 나타났다 (92.2% and 86.4% Vs 15% and 6.7%). KO-DMEM/FBS와 DMEM-F12/FBS의 실험군의 경우 조기 분화에 의해 3계대 이상의 계대 배양 유지가 불가능하였다. KO-DMEM/SR과 DMEM-F12/SR 실험군 간의 배양 양상을 비교해 보면 두 실험군 간의 부착률과 세포 분열에 따른 세포군 면적에서는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 현미경상에서 DMEM-F12/SR 실험군의 세포간 간격이 KO-DMEM/SR 실험군보다 조밀하게 관찰되었다. 그러나 계대 배양 7일 후의 배아 줄기세포군의 부분적인 분화률에선 DMEM-F12/SR 실험군이 KO-DMEM/SR 실험군보다 높게 나타났다 (30.7% Vs 7.1%). 두 실험군의 배아 줄기세포의 미분화 특성 확인 결과 alkaline phosphatase 및 SSEA-4가 강하게 발현되었으며, SSEA-3는 부분적으로 발현되고 SSEA-1은 발현되지 않았다. 또한 두 실험군에서 모두 Oct-4 mRNA가 강하게 발현됨으로써 배아 줄기세포가 미분화 특성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

**결 론:** 본 실험 결과, SNUhES2을 이용한 실험에서 배양액내 serum replacement 성분이 fetal bovine serum보다 인간 배아 줄기세포의 계대 배양에 보다 효과적이었으며, Knockout-DMEM과 DMEM-F12

의 기본 배양액 간에서는 DMEM-F12 배양액에서 배아 줄기세포군의 부분적 분화률이 높게 나타난 것을 제외하고는 미분화 특성을 유지하는데는 차이가 없는 것으로 나타났다.

## P-30 A New Protocol for Effective Cryopreservation of hES Cells by Minimum Volume Cooling (MVC) Method

마리아 생명공학연구소/마리아 기초의학연구소, <sup>1</sup>건국대학교, <sup>2</sup>마리아병원

김은영 · 이금실 · 신현아 · 조현정 · 안소연 · 이영재  
박세필 · 정길생<sup>1</sup> · 임진호<sup>2</sup>

**Objective:** Human embryonic stem (hES) cells are being very important resources for study on cell replacement therapy, other medical applications or basic scientific research, and thus their efficient cryopreservation is inevitably needed. This study was to examine whether the newly developed MVC vitrification method can be used for the freezing of hES cells.

**Materials and Methods:** In this study, hES cell colonies (MB03) were cryopreserved by either the slow-cooling method using StrataCooler<sup>®</sup> (Stratagene) as a control method or MVC vitrification method using modified French-mini straw (500  $\mu$ l, IMV) (we designated it as MVC straw). hES cell colonies cultured on mouse embryonic fibroblast (STO cell, ATCC) feeder using ES culture medium were mechanically dissected into several small clumps following by collagenase treatment. In experiment I, with the slow-cooling method, about 20~30 clumps of hES cells were transferred into a cryo-vial containing 1 ml freezing medium (10% DMSO added ES culture medium). The vials were slowly cooled in a StrataCooler<sup>®</sup> at -80<sup>°</sup>C deep-freezer and then plunged in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) on next day. The vials were rapidly thawed in a water bath at 37<sup>°</sup>C. At thawing, freezing medium is gradually diluted in ES culture medium for 20~30 min. hES cell clumps were recovered using micropipette and then plated onto a fresh feeder layer. In experiment II, hES cell clumps were vitrified using MVC straw which were prepared by cutting end place of one side. Ten hES cell clumps were loaded onto one MVC straw using micropipette followed by exposure in two vitrification solution (VS); 10% ethylene glycol (EG) and 10% FBS added D-PBS for 5 min in the first step, then 30% EG + 0.5 M sucrose (S) + 10% FBS added D-PBS for 20 sec in the second step. And then MVC straw was plunged directly into LN<sub>2</sub>. Thawing was rapidly performed by 5-step (1 MS, 0.5 MS, 0.25 MS, 0.125 MS and 10% FBS added D-PBS). Then recovered hES cell clumps were plated onto a fresh feeder layer.

**Results:** Pluripotent hES cell clumps were successfully cryopreserved by slow-cooling or vitrification method, and the cells retained hES characteristics after thawing. All clumps were recovered without any cell loss. At day 2 after thawing, cell survivabilities in vitrification method, which we confirmed as attachment of hES cell clumps onto feeder cell layer, were higher (94.3%, 66/70) than that in slow-cooling method (82.8%, 53/64), respectively. However, in MVC vitrification method, survived hES cell clumps were growing out with stable proliferation rate and they indicated normal karyotype, positively immunostained (AP, SSEA-4, TRA-1-60) using surface marker antibodies and high telomerase activity. Also, it